

**PENGARUH PREVENTIF EKSTRAK *GREEN COFFEE* (*Coffea canephora*) TERHADAP EKSPRESI *TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA* (TGF- β) DAN HISTOPATOLOGI JEJUNUM TIKUS PUTIH
MODEL GASTROENTERITIS
INFEKSI *Escherichia coli***

SKRIPSI

Oleh :
BENY SETIAWAN
145130100111017



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**PENGARUH PREVENTIF EKSTRAK *GREEN COFFEE* (*Coffea canephora*) TERHADAP EKSPRESI *TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA* (TGF- β) DAN HISTOPATOLOGI JEJUNUM TIKUS PUTIH
MODEL GASTROENTERITIS
INFEKSI *Escherichia coli***

SKRIPSI

Oleh :
BENY SETIAWAN
145130100111017



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

PENGARUH PREVENTIF EKSTRAK *GREEN COFFEE* (*Coffea canephora*) TERHADAP EKSPRESI *TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA* (TGF- β) DAN HISTOPATOLOGI JEJUNUM TIKUS PUTIH MODEL GASTROENTERITIS INFEKSI *Escherichia coli*

Oleh:

BENY SETIAWAN
NIM. 145130100111017

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 18 Juli 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Sri Murwani, drh., MP
NIP. 19630101 198903 2 001

drh. Dahliatul Qosimah, M.Kes
NIP. 19820127 201504 2 001

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Beny Setiawan

NIM : 145130100111017

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Proposal Skripsi Berjudul:

Pengaruh Preventif Ekstrak *Green Coffee (Coffea canephora)* Terhadap Ekspresi *Transforming Growth Factor Beta (TGF- β)* Dan Histopatologi Jejunum Tikus Putih Model Gastroenteritis Infeksi *Escherichia coli*

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari proposal skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termasuk di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam proposal skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata proposal skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 18 Juli 2018
Yang menyatakan,

BENY SETIAWAN

NIM. 145130100111017

Pengaruh Preventif Ekstrak *Green Coffee (Coffea canephora)* Terhadap Ekspresi *Transforming Growth Factor Beta (Tgf-B)* Dan Histopatologi Jejunum Tikus Putih Model Gastroenteritis Infeksi *Escherichia coli*

ABSTRAK

Gastroenteritis adalah kondisi penyakit yang ditandai dengan inflamasi pada saluran pencernaan yang menyebabkan gejala muntah dan diare. *Escherichia coli* merupakan salah satu patogen penyebab gastroenteritis pada hewan. Infeksi *E. coli* menyebabkan timbulnya kerusakan mukosa pada saluran pencernaan. Penanganan alternatif yang dapat diberikan salah satunya yaitu tanaman kopi. Biji kopi memiliki banyak kandungan senyawa kimia, salah satunya yaitu asam klorogenat. Asam klorogenat berfungsi sebagai antioksidan, antiinflamasi dan antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek preventif ekstrak *green coffee* pada tikus model gastroenteritis infeksi *E. coli* terhadap peningkatan ekspresi TGF- β dan penurunan kerusakan jejunum. Penelitian bersifat eksperimental menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap). Hewan model berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan umur 8-12 minggu dengan berat badan 150-200 gram sebanyak 20 ekor yang dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu: kelompok kontrol negatif (tanpa diberikan perlakuan), kelompok kontrol positif (injeksi deksametason sebagai immunosupresan dengan dosis 5 mg/kgBB selama 3 hari dan diinfeksi *E. coli* 10^8 CFU/ml peroral sebanyak 1 ml/ekor selama 7 hari), kelompok preventif (diberikan ekstrak *green coffee* dengan dosis 500 mg/kgBB, 1000 mg/kgBB, dan 1500 mg/kgBB selama 24 hari). Parameter yang diukur adalah ekspresi TGF- β dan histopatologi jejunum. Ekspresi TGF- β diukur menggunakan imunohistokimia dan dianalisis dengan uji *one way ANOVA* ($\alpha=0,05$). Pengamatan histopatologi jejunum menggunakan pewarnaan *Hematoksin-eosin* (HE) dianalisa secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan pemberian ekstrak *green coffee* dosis 1500 mg/kgBB merupakan dosis yang lebih baik untuk meningkatkan ekspresi TGF- β dan dapat memperbaiki kerusakan jaringan jejunum. Kesimpulannya, bahwa ekstrak *green coffee* dapat memberikan pengaruh preventif pada tikus putih model gastroenteritis.

Kata kunci: Gastroenteritis, Kopi, *E. coli*, Sitokin antiinflamasi

The Preventive Effect of Green Coffee Extract (*Coffea canephora*) towards Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) Expression and Histopathology of White Rat's Jejunum in Gastroenteritis Model *Escherichia Coli* Infection

ABSTRACT

Gastroenteritis is a disease condition indicated by inflammation on digestive tract that causes symptoms like vomit and diarrhea. *Escherichia coli* is one of the pathogenic bacteria that causes gastroenteritis in animals. *E. coli* infection caused the incidence of mucosal gastrointestinal damage. Alternative prevention which we can give is coffee plants. Coffee beans has many chemical compounds, one of which is chlorogenic acid. Chlorogenic acid serves as an antioxidant, antiinflammatory and antibacterial. The purpose of this research was to find out the preventive effect of green coffee extract that infected with *E. coli* towards increased of TGF- β expression and decreased of jejunum damage. This experimental research used completely randomized experimental. Animal models was used a male white rat (*Rattus norvegicus*) with age 8-12 week, body weight 150-200 grams and divided into 5 groups; a negative control group (without treatment given), a positive control group (injected with dexamethasone as immunosupresant with dose of 5 mg/kgBW for 3 days and infection *E. coli* 10^8 CFU/ml as many as 1 ml/tail of peroral for 7 days), and preventive group (given green coffee extracts with dose of 500 mg/kgBW, 1000 mg/kgBW, and 1500 mg/kgBW during 24 days). Parameter that measured in the research was expression of TGF- β and jejunum histopathology. The expression of TGF- β measured by immunohistochemical and analyzed with one way ANOVA ($\alpha=0,05$). Jejunum histopathology observation use Hematoxylin-eosin staining analyzed quantitative descriptively. The result showed that green coffee extract with dose of 1500 mg/kgBW is better to increase the expression levels of TGF- β and can repair damaged tissues jejunum. In conclusion, of this research green coffee extract can give preventive effect towards gastroenteritis bacterial rat's.

Keywords: Gastroenteritis, Coffee, *E. coli*, Cytokine antiinflammatory

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa atas segala limpahan rahmat, taufik, serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir/skripsi yang berjudul “**Pengaruh Preventif Ekstrak *Green Coffee (Coffea canephora)* Terhadap Ekspresi *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β) dan Histopatologi Jejunum Tikus Putih Model Gastroenteritis Infeksi *Escherichia coli*”**. Penelitian ini adalah bagian dari salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.

Dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati, penulis mengucapkan terimakasih kepada segenap pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu dalam penyusunan skripsi ini. Ucapan terima kasih terutama kepada :

1. Dr. drh. Djoko Winarso, MS dan Dr. Sri Murwani, drh., MP., sebagai pembimbing satu dan drh. Dahliatul Qosimah, M.Kes., sebagai pembimbing dua atas bimbingan, bantuan, saran, kesabaran, nasihat, serta waktu yang telah diberikan kepada penulis.
2. drh. Indah Amalia Amri, M. Si, sebagai dosen penguji satu dan drh. Aulia Firmawati, M. Vet sebagai dosen penguji dua yang telah banyak memberikan saran dan kritik yang membangun kepada penulis.
3. Prof. Dr. Ir. Djalal Rosyidi, MS., Dr. Ir. Lilik Eka Radiati, MS., drh. Indah Amalia Amri, M. Si, dan drh. Dodik Prasetyo, M. Vet., sebagai dosen payung

penelitian yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk turut serta dalam penelitian.

4. Keluarga penulis, Ibu Nikwati, Bapak Mustakim, Kakak Ayu Imma., yang memberi kasih sayang, dorongan, nasehat dan dukungan untuk menyelesaikan studi.
5. Teman seperjuangan skripsi (Mohamad Khairul Wahid, Julian, Anganti, Feby) atas kontribusi, bantuan dan inspirasi dalam menyelesaikan penelitian ini.
6. Yurisa Noviaji Pranoto yang selalu memberikan semangat dan dukungan untuk segera menyelesaikan studi.
7. Aldi, Novrijal, Icha dan Aish yang saling memberikan semangat dan dukungan.
8. Seluruh teman dan keluarga *Brave* di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya dan teman-teman angkatan 2014 pada umumnya.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah iberikan kepada penulis dan semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat serta menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca.

Malang, 18 Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
LEMBAR PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Gastroenteritis	6
2.2 Bakteri <i>E. coli</i>	10
2.3 Kopi	17
2.4 Deksametason	24
2.5 Hewan Coba	26
2.6 Jejunum	27
2.7 <i>Transforming Growth Factor Beta</i> (TGF- β)	30
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	32
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	32
3.2 Hipotesis Penelitian	35
BAB IV METODE PENELITIAN	36
4.1 Waktu dan Tempat	36
4.2 Alat dan Bahan	36
4.3 Sampel Penelitian	37
4.4 Rancangan Penelitian	38
4.5 Variabel Penelitian	39
4.6 Tahapan Penelitian	40
4.6.1 Pembuatan Ekstrak <i>Green Coffee</i> (<i>Coffea canephora</i>)	40
4.6.2 Pembuatan Suspensi Bakteri	40
4.6.3 Pemberian Terapi Ekstrak <i>Green Coffee</i>	41
4.6.4 Pembuatan Hewan Model Gastroenteritis	42
4.6.5 Isolasi Organ Jejunum	43
4.6.6 Pembuatan Preparat Histopatologi Jejunum dengan Pewarnaan HE	43
4.6.7 Pengukuran Ekspresi TGF- β dengan Imunohistokima	44

4.6.8 Analisis Data	46
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	47
5.1 Hasil Deteksi Asam Klorogenat	47
5.2 Penelitian Pendahuluan	47
5.3 Hewan Coba Model Gastroenteritis Hasil Infeksi <i>E. coli</i>	48
5.4 Pengaruh Preventif Ekstrak <i>Green Coffee (Coffea canephora)</i> terhadap Ekspresi TGF- β Jejunum	50
5.5 Pengaruh Preventif Ekstrak <i>Green Coffee (Coffea canephora)</i> terhadap Histopatologi Jejunum	59
BAB VI PENUTUP	67
6.1 Kesimpulan	67
6.2 Saran	67
DAFTAR PUSTAKA	68
LAMPIRAN	76



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Kandungan Senyawa Biji Kopi	21
4.1 Rancangan Kelompok Penelitian.....	38
5.1 Hasil Uji BNJ Ekspresi TGF- β	55



DAFTAR GAMBAR

GAMBAR	Halaman
2.1 Morfologi <i>E. coli</i>	11
2.2 Buah dan Biji Tanaman Kopi Robusta	19
2.3 Struktur Buah Kopi Ilustrasi Melintang	20
2.4 Struktur Asam Klorogenat (CGA)	22
2.5 Rumus Molekul Deksametason	25
2.6 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	26
2.7 Histotologi Jejunum Tikus Putih Pewarnaan HE	29
2.8 Histopatologi Jejunum Infeksi <i>E. coli</i>	30
3.1 Kerangka Konsep	32
5.1 Feses Tikus Putih Penelitian	50
5.2 Gambaran IHK Ekspresi TGF- β Kelompok Kontrol Negatif	51
5.3 Gambaran IHK Ekspresi TGF- β Kelompok Kontrol Positif	51
5.4 Gambaran IHK Ekspresi TGF- β Kelompok Kontrol Preventif 1	52
5.5 Gambaran IHK Ekspresi TGF- β Kelompok Kontrol Preventif 2	52
5.6 Gambaran IHK Ekspresi TGF- β Kelompok Kontrol Preventif 3	53
5.7 Histogram Nilai <i>Mean</i> dan Standar Deviasi Ekspresi TGF- β	54
5.8 Histologi Jejunum Kelompok Kontrol Negatif	60
5.9 Histopatologi Jejunum Kelompok Kontrol Positif	61
5.10 Histopatologi Jejunum Kelompok Kontrol Preventif 1	63
5.11 Histopatologi Jejunum Kelompok Kontrol Preventif 2	64
5.12 Histopatologi Jejunum Kelompok Kontrol Preventif 3	65

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN	Halaman
1. Skema Penelitian	77
2. Tabel Konversi Dosis	78
3. Perhitungan Dosis	79
4. Langkah Kerja Penelitian	81
5. Hasil Analisa Statistika Ekspresi TGF- β	83
6. Sertifikat Laik Etik	88
7. Determinasi Tanaman Kopi Robusta	90
8. Surat Keterangan Ekstraksi	91
9. Hasil Uji LC-MS	92
10. Identifikasi Hasil Uji LC-MS	93
11. Dokumentasi Kegiatan	94



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<u>Simbol/ Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
%	Persen
gr	Gram
ml	Mililiter
mm	Milimeter
<	Kurang dari
>	Lebih dari
AEKI	Asosiasi Eksportir dan Industri Kopi Indonesia
EPEC	Enteropathogenic <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoxigenic <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
EHEC	Enterohaemorrhagic <i>E. coli</i>
VTEC	Verotoxic <i>E. coli</i>
LT	Labile Toxin
ST	Stabile Toxin
CGA	Chlorogenic Acid
ROS	Reactive Oxygen Spesies
DNA	Deoxyribose Nucleid Acid
SPF	specific pathogenic free
LPS	Lipopolisakarida
CNF	cytotoxic necrotyzing factor
NBT	nitro blue tetrazolium
HE	Hematoxylin Eosin
H ₂ O ₂	Hydrogen Peroxide
PBS	Phospate Buffer Saline-Azida
TGF	Transforming Growth Factor
MMP	Matrix Metalloprotease
TNF	Tumor Nekrosis Faktor
NAP	Nutrient Agar Plate
EMBA	Eosin Methylen Blue Agar
BSA	Bovine Serum Albumin
NB	Nutrient Borth
ANOVA	Analisis Of Varian
BNJ	Beda Nyata Jujur
SPSS	Statistical Product of Service Solution
SAHRP	Strep Avidin Horse Radish Peroxidase
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrofotometry

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Gastroenteritis adalah kondisi peradangan yang ditandai pada saluran pencernaan dengan melibatkan gastrium dan intestinal, sehingga mengakibatkan kombinasi diare, muntah, dan sakit serta kejang perut. Secara umum, gastroenteritis merupakan kelainan klinik yang disebabkan inflamasi pada mukosa intestinal, dapat berupa akut maupun kronik (Suraatmaja, 2005). Gastroenteritis akut merupakan penyebab utama angka kesakitan dan kematian pada anak-anak dan pada hewan ternak infeksi *E. coli* disebut dengan kolibasilosis. Bakteri ini menyerang dapat menyerang anak sapi di bawah umur 14 hari, bahkan pada banyak kasus, kematian pada anak sapi terjadi pada umur kurang dari 1 minggu (Esfandiari dkk, 2011; Poerwati, 2013).

Escherichia coli merupakan jenis spesies bakteri gram negatif yang umumnya menjadi mikroflora normal pada usus manusia dan hewan, tetapi beberapa galur bersifat patogenik (Wibowo dan Wahyuni, 2008). Dalam kondisi normal *E. coli* terdapat di dalam saluran pencernaan ayam. Sekitar 10-15 % dari seluruh *E. coli* yang ditemukan di dalam usus ayam yang sehat tergolong serotip patogen. Bagian usus yang paling banyak mengandung flora normal tersebut adalah jejunum, sekum, dan illeum (Tarmudji, 2003).

Jejunum merupakan bagian dari usus halus yang berperan dalam dalam sistem pencernaan. Jejunum berfungsi sebagai tempat absorpsi zat-zat makanan. Bakteri dapat menginfeksi saluran pencernaan yang kemudian menempel di

mukosa usus halus, menembus sel-sel epitel dan menyebar melalui mukosa hingga menuju ke aliran pembuluh darah (Lavoie and Hinchcliff, 2008). *Escherichia coli* patogen melekat pada mukosa usus halus dan menyebabkan perubahan struktur epitel, sehingga merusak struktur mukosa pencernaan. Kerusakan mikrovili dan atropi vili usus halus dapat mengganggu penyerapan nutrisi. Keadaan tersebut menimbulkan gangguan fungsi peristaltik dan sekresi usus meningkat, tetapi fungsi absorpsi usus menurun sehingga menimbulkan keadaan diare (Suraatmaja, 2005).

E. coli menghasilkan endotoksin berupa lipopolisakarida (LPS) dan dilepaskan saat bakteri mengalami lisis atau pecahnya sel. Kemudian endotoksin direspon oleh sel-sel inflamasi dan mengakibatkan inflamasi. Sel-sel inflamasi yang teraktivasi akan menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) sebagai respon terhadap beberapa rangsangan. Ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan di dalam tubuh mengakibatkan stress oksidatif (Caramori, 2004). Makrofag juga mensekresikan enzim *Matrix Metalloproteases* (MMPs) untuk membersihkan jaringan nekrotik pada daerah luka. Makrofag memicu pelepasan mediator sitokin pro-inflamasi, yaitu *Tumor Necrosis Factor* (TNF) dan *Interleukin* (IL). Selain itu makrofag juga mengaktivasi *Growth Factor* dimana menimbulkan bermacam-macam respon seluler seperti proliferasi, diferensiasi, survival dan angiogenesis (Saeed *et al.*, 2015). *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β) berperan sebagai antiinflamasi dengan cara mengontrol respon inflamasi akut (Trihono, 2011). TGF- β merupakan sitokin multifungsi yang memodulasi proliferasi, pertumbuhan, diferensiasi, adesi dan kelangsungan hidup sel, selain itu

juga berperan dalam produksi protein matriks ekstraselular (Hermendy dan Pawarti, 2017).

Salah satu penanganan terhadap gastroenteritis (diare) yaitu dengan pemberian antibiotika. Pemakaian antibiotika yang meluas dan tidak rasional menjadi penyebab utama resistensi antibiotika dan kegagalan pengobatan (Utami, 2012). Sehingga diperlukan untuk mencari alternatif yang lebih efektif dalam menghambat aktivitas bakteri, salah satunya yaitu dengan penggunaan biji kopi. Tanaman kopi yang banyak dijumpai di Indonesia yaitu kopi arabika (*Coffea arabica*) dan kopi robusta (*Coffea canephora*). Biji kopi dari kedua spesies ini memiliki banyak senyawa aktif, salah satunya adalah senyawa golongan fenol yaitu contohnya asam klorogenat (Hecimovic *et al.*, 2011). Asam klorogenat (CGA) merupakan salah satu kandungan dalam biji kopi yang mampu menghambat aktivitas bakteri, dimana kopi robusta mempunyai kandungan sebanyak 6.1–11.3 g/100g (Yaqin dan Nurmilawati, 2015). Senyawa CGA (*Chlorogenic acid*) yaitu memiliki efek antioksidan yang tinggi dan antiinflamasi (Liang and Kitts, 2015), serta sebagai antibakteri (Farah *et al.*, 2008).

Dari latar belakang di atas maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh preventif pemberian *green coffee* (*Coffea canephora*) yaitu senyawa CGA (*Chlorogenic acid*) terhadap ekspresi TGF- β dan perubahan histopatologi jejunum pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) model gastroenteritis.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan yaitu:

1. Apakah ekstrak *green coffee* (*Coffea canephora*) mempunyai pengaruh preventif pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model gastroenteritis yang diinfeksi *E. coli* terhadap peningkatan ekspresi TGF- β ?
2. Apakah ekstrak *green coffee* (*Coffea canephora*) mempunyai pengaruh preventif pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model gastroenteritis yang diinfeksi *E. coli* terhadap pencegahan kerusakan jaringan jejunum?

1.3 Batasan Masalah

Batasan-batasan permasalahan yang diperoleh dari latar belakang yang telah diuraikan antara lain:

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar umur 8-12 minggu, dengan berat badan 150-200 gram. Infeksi *E. coli* diberikan menggunakan sonde lambung dengan dosis 1 ml mengandung 10^8 CFU/mL selama 7 hari (Astawan dkk, 2011).
2. Biji kopi yang digunakan adalah kopi jenis robusta (*Coffea canephora*) yang diperoleh dari perkebunan di Lampung tanpa proses penyangraian.
3. Ekstrak *green coffee* (*Coffea canephora*) diberikan secara per oral dengan dosis 500, 1000, 1500 mg/kgBB dalam sehari diberikan sekali selama 24 hari dengan menggunakan sonde lambung. Pemberian dosis mengacu pada

dosis pemberian ekstrak pada mencit yang berkisar 50-250 mg/kgBB yang terlebih dahulu dikonversikan pada tikus (Haque *et al.*, 2013).

4. Variabel ekspresi TGF- β diukur menggunakan metode imunohistokimia.
5. Histopatologi jejunum diwarnai menggunakan Hematoksilin Eosin (HE) yang diamati dengan mikroskop perbesaran 400x (Wresdiyati dkk, 2013).

Perubahan yang diamati berupa vili usus, sel radang, sel goblet.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian yang diperoleh dari latar belakang yang telah diuraikan antara lain:

1. Mengetahui pengaruh preventif ekstrak *green coffee* (*Coffea canephora*) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model gastroenteritis yang diinfeksi *E. coli* terhadap peningkatan ekspresi TGF- β .
2. Mengetahui pengaruh preventif ekstrak *green coffee* (*Coffea canephora*) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model gastroenteritis yang diinfeksi *E. coli* terhadap pencegahan kerusakan jaringan jejunum.

1.5 Manfaat

Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi tentang pemanfaatan ekstrak *green coffee* (*Coffea canephora*) sebagai pengembangan obat herbal alternatif (preventif) dalam penanganan untuk penyakit gastroenteritis.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Gastroenteritis

Gastroenteritis adalah inflamasi membran mukosa lambung dan usus halus yang ditandai dengan muntah-muntah dan diare yang berakibat kehilangan cairan elektrolit yang menimbulkan dehidrasi dan gejala keseimbangan elektrolit. Gastroenteritis adalah kehilangan cairan dan elektrolit secara berlebihan yang terjadi karena frekuensi buang air besar yang sering dengan bentuk tinja yang encer dan cair (Fadhilah, 2015).

Gastroenteritis adalah suatu penyakit karena adanya peradangan pada permukaan lambung dan usus yang biasanya terjadi akibat infeksi mikroorganisme, namun dapat juga akibat mengkonsumsi bahan kimia beracun atau obat tertentu. Gastroenteritis dibagi atas dua faktor, yaitu faktor infeksi dan faktor makanan. Faktor infeksi didapat dari virus, parasit, bakteri, dan protozoa (Chow *et al.*, 2010).

2.1.1 Etiologi Gastroenteritis

Gastroenteritis dapat disebabkan oleh faktor internal antara lainnya yaitu:

- a. Golongan virus: *Astrovirus*, *Calicivirus*, *Enteric adenovirus*, *Coronavirus*, *Rotavirus*, *Norwalk virus*, *Herpes simplex virus*, *Cytomegalovirus*
- b. Golongan bakteri: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Plesiomonas shigelloides*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, dan *Yersinia enterocolitica*

- c. Golongan parasit: *Balantidium coli*, *Capillaria philippinensis*, *Cryptosporidium*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Isospora belli*, *Fassiolopsis buski*, *Sarcocystis suihominis*, *Strongyloides stercoralis*, dan *Trichuris trichiura* (Chow *et al.*, 2010).

Bakteri penyebab gastroenteritis dibagi menjadi dua golongan besar, yaitu bakteri noninvasif dan bakteri invasif. Golongan bakteri noninvasif adalah *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae*, *E. coli* patogen. Sedangkan golongan bakteri invasif meliputi *Shigella*, *Salmonella typhi*, *Campylobacter*, *Vibrio non-cholera*, *Yersinia*, *Enterohemorrhagic E. coli*, *Aeromonas*, dan *Plesiomonas* (Amin, 2015).

2.1.2 Penularan Gastroenteritis

Penularan gastroenteritis bisa melalui fecal-oral dari satu penderita ke yang lainnya. Beberapa kasus ditemui penyebaran patogen dikarenakan makanan dan minuman yang terkontaminasi. Mekanisme dasar penyebab timbulnya diare adalah gangguan osmotik. Selain itu menimbulkan gangguan sekresi akibat toksin di dinding usus, sehingga sekresi air dan elektrolit meningkat kemudian terjadi diare. Akibat dari diare itu sendiri adalah kehilangan air dan elektrolit (dehidrasi) yang mengakibatkan gangguan asam basa, gangguan gizi (input kurang, output berlebih), hipoglikemia dan gangguan sirkulasi darah (Suraatmaja, 2005).

2.1.3 Gejala Klinis

Infeksi *E. coli* salah satunya pada ayam dikenal dengan istilah kolibasilosis. Bentuk kolibasilosis yang lebih spesifik menyerang saluran pencernaan adalah bentuk diare dan koligranuloma. Salah satu gejala klinis yang

dapat diamati adalah adanya diare berwarna kuning. Gejala klinis tersebut diikuti pula oleh perubahan patologi anatomi, dimana pada kolibasilosis bentuk diare ditemukan usus yang mengalami peradangan (enteritis) (Info Medion, 2011).

Infeksi dari bakteri *E. coli* yang menimbulkan gangguan fungsi usus dimana peristaltik dan sekresi usus meningkat, namun fungsi dan absorpsi usus berkurang sehingga menimbulkan gejala klinis berupa diare (Fadhilah, 2015).

2.1.4 Patogenesis Gastroenteritis Akibat *E. coli*

Gastroenteritis bisa disebabkan oleh empat hal, yaitu faktor infeksi (bakteri, virus, parasit), faktor malabsorpsi, faktor makanan, dan faktor psikologis. Diare yang disebabkan malabsorpsi makanan oleh usus terjadi karena peningkatan tekanan osmotik didalam rongga usus. Peningkatan tekanan osmotik disebabkan adanya makan yang tidak dapat terserap. Sehingga terjadi aliran air dan elektrolit berlebih ke rongga usus, isi rongga usus yang berlebihan akan merangsang usus untuk mengeluarkannya, sehingga terjadi diare (Ngastiyah, 2005).

Peradangan pada usus dan lambung dapat menimbulkan peningkatan motilitas usus sehingga sekresi cairan dan elektrolit meningkat yang dapat menimbulkan gangguan cairan dan elektrolit seperti kalium dan natrium mengakibatkan kejang dan kram abdomen sehingga menimbulkan rasa nyeri. Peradangan pada usus dan lambung juga dapat mengakibatkan meningkatnya permeabilitas usus yang dapat meningkatkan sekresi cairan dan elektrolit serta meningkatnya tekanan intra lumen, maka usus tidak mempunyai kemampuan untuk menyerap sehingga terjadi pengeluaran feses dengan tekstur encer dan frekuensi buang air besar yang berlebihan, konsistensi cair, dan bersifat asam

sehingga dapat menimbulkan gangguan integritas kulit. Selain itu peningkatan cairan dan elektrolit dapat mengakibatkan peningkatan tekanan pada intralumen yang akan menimbulkan terjadinya dehidrasi (Try, 2011).

2.1.5 Patologi Anatomi

E. coli patogen menghasilkan endotoksin akan berakibat menurunnya absorpsi natrium pada usus dan lumen usus meregang yang diikuti dengan peningkatan peristaltik usus sehingga terjadi diare. Patologi oleh infeksi *E. coli* dapat diamati pada semua bagian usus. Kongesti maupun hiperemi akan teramati pada saluran pencernaan hewan yang terinfeksi (Rahmawandani dkk., 2014).

Perubahan patologi anatomi yang menciri pada gastroenteritis adalah terlihat adanya fibrin yang melapisi hampir semua organ-organ abdomen dan adanya akumulasi cairan pada organ abdomen. Perubahan secara makroskopis pada organ intestin berupa adanya distensi dan pembengkakan usus (Nielsen *et al*, 2005).

2.1.6 Peneguhan Diagnosa

Diagnosa gastroenteritis yang disebabkan bakteri dapat dilihat dari manifestasi klinis, yaitu individu mengalami diare akut karena infeksi dapat disertai keadaan muntah-muntah, demam, tenesmus, hematochezia, nyeri perut atau kejang perut. Penegakan diagnosa dapat dilakukan isolasi feses untuk mengetahui penyebab adanya infeksi oleh bakteri, virus atau parasit dengan mengkultur di laboratorium khusus (Zein *et al*, 2004).

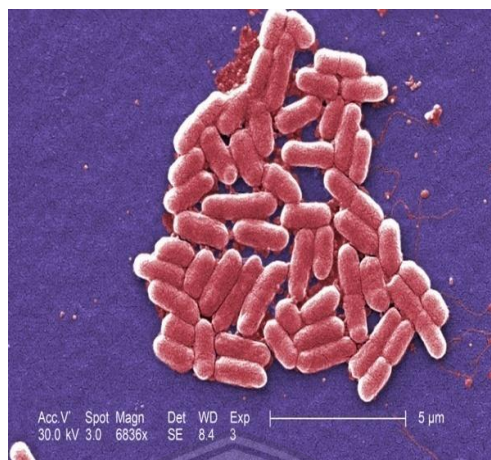
2.1.7 Pencegahan dan Pengobatan

Pencegahan infeksi *E. coli* dapat dilakukan dengan program sanitasi yang baik dan benar. Selain itu, juga penting untuk mengusahakan agar pakan dan minum tidak tercemar oleh feses (Kusuma, 2010).

Pemberian antibiotik diindikasikan pada pasien dengan gejala dan tanda diare seperti demam dan feses berdarah. Contoh antibiotik untuk gastroenteritis, yaitu *Ciprofloxacin*, *Tetrasiklin*, *Metronidazole* (Zein *et al.*, 2004). Obat anti diare yang dapat diberikan, yakni *Loperamide HCl*. Efek kelompok obat tersebut meliputi peningkatan absorpsi cairan sehingga dapat memperbaiki konsistensi feses dan mengurangi frekuensi diare. Bila diberikan dengan cara yang benar obat ini cukup aman dan dapat mengurangi frekuensi defekasi sampai 80%. Bila diare akut dengan gejala demam dan sindrom disentri maka penggunaan obat ini tidak dianjurkan (Nurmasari, 2010).

2.2 Bakteri *Eschericia coli*

Bakteri *E. coli* merupakan spesies dengan habitat alami dalam saluran pencernaan manusia maupun hewan. *E. coli* pertama kali diisolasi oleh Theodor Escherich dari tinja seorang anak kecil pada tahun 1885. Morfologi bakteri *E. coli* (**Gambar 2.1**) berbentuk batang, berukuran 0,4-0,7 x 1,0-3,0 μm , termasuk gram negatif, dapat hidup soliter maupun berkelompok, umumnya motil, tidak membentuk spora, serta fakultatif anaerob (Carter *and* Wise, 2004).



Gambar 2.1: Morfologi *E. coli* (Carter and Wise, 2004)

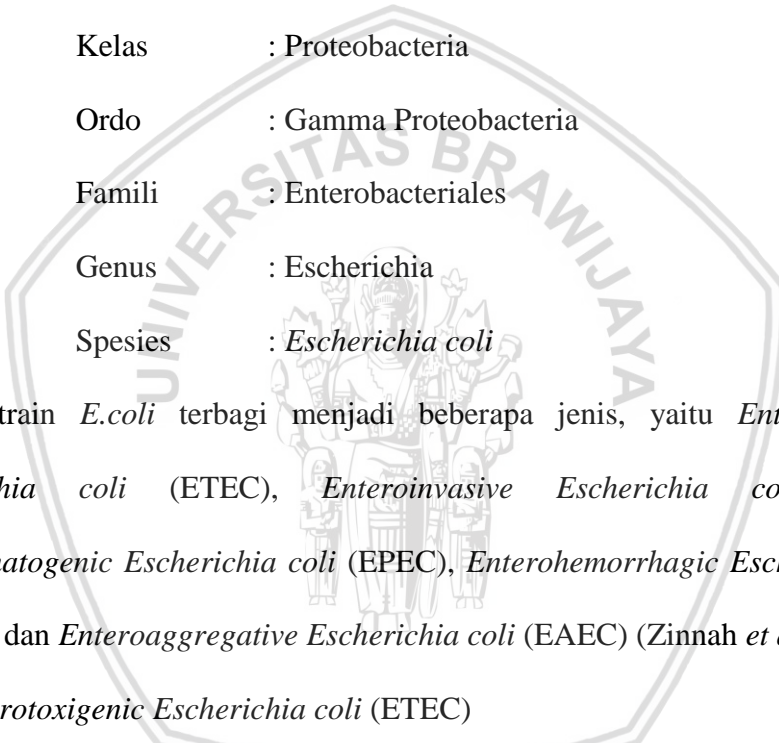
E. coli merupakan jenis flora normal usus yang bekerja untuk menfermentasi gula sederhana seperti dekstrosa, sukrosa, maltose, laktosa dan manitol menjadi bentuk asam dan gas. Pada kondisi normal, *E. coli* berperan sebagai flora normal yang melakukan fungsinya dengan menekan pertumbuhan bakteri berbahaya serta terlibat dalam proses sintesis beberapa jenis vitamin (Zinnah *et al.*, 2007). Menurut Elfandiari dkk (2011) selain tersebar di banyak tempat dan kondisi, bakteri ini tahan terhadap suhu, bahkan pada suhu ekstrim sekalipun. Suhu yang baik untuk pertumbuhan bakteri ini adalah antara 8– 46°C, tetapi suhu optimalnya adalah 37°C.

E. coli merupakan salah satu flora normal pada pencernaan, namun beberapa strain *E. coli* mampu bersifat patogen dan menyebabkan infeksi pada sistem pencernaan. Patogenitas *E. coli* dalam menghasilkan beberapa jenis toksin, seperti enterotoksin, verotoksin, kolisin, dan siderofor serta resistensinya pada aksi litik dari komplemen hospes dan antibiotik. *E. coli* juga merupakan patogen utama dari infeksi gastroenteritis. *E. coli* diklasifikasikan oleh ciri khas sifat-sifat

virulensinya dan setiap kelompok menimbulkan penyakit melalui mekanisme yang berbeda (Biswas *et al.*, 2006).

2.2.1 Klasifikasi dan Taksonomi

Klasifikasi bakteri *E. coli* menurut Songer (2005) adalah sebagai berikut ini:



Kingdom	: Bacteria
Kelas	: Proteobacteria
Ordo	: Gamma Proteobacteria
Famili	: Enterobacteriales
Genus	: Escherichia
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>

Strain *E.coli* terbagi menjadi beberapa jenis, yaitu *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC), *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC), *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC), *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC), dan *Enteraggregative Escherichia coli* (EAEC) (Zinnah *et al.*, 2007).

a. *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC)

Faktor kolonisasi ETEC yang spesifik untuk manusia menimbulkan pelekatan ETEC pada sel epitel usus kecil. Lumen usus terengang oleh cairan dan mengakibatkan hipermotilitas serta diare, dan berlangsung selama beberapa hari. Beberapa strain ETEC menghasilkan eksotoksin tidak tahan panas. Diare tanpa disertai demam ini terjadi pada manusia, babi, domba, kambing, kuda, anjing, dan sapi. Infeksi ETEC disebabkan oleh toksin LT (*Labile toxin*) dan ST (*Stable toxin*) yang menyebabkan sekresi cairan secara melimpah melalui aktivasi adenil siklase

dan guanil atsiklasi pada jejunum dan ileum. Hal ini menyebabkan watery diarrhea disertai kram (Hendrayati, 2012).

b. *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC)

EPEC termasuk dalam kelompok bakteri patogen yang dikenal sebagai *attaching and effacing* (A/E) pathogen yang mampu melekat dan membentuk lesi pada sel epitel intestinal. Dari enam pathovars diarrheagenic *E. coli*, EPEC adalah pathotipe pertama yang diidentifikasi, istilah EPEC mulai digunakan pada tahun 1955 pada kejadian wabah diare tahun 1950-an. EPEC melekat pada sel mukosa usus kecil dan menyebabkan gangguan absorpsi. EPEC melibatkan adhesin intimin untuk berikatan dengan sel inang dan membentuk padestal aktin sehingga terbentuk A/E lesion (Croxen *et al.*, 2013).

c. *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC)

EIEC menimbulkan penyakit yang sangat mirip dengan shigelosis. Galur EIEC bersifat non-laktosa atau melakukan fermentasi laktosa dengan lambat serta bersifat tidak dapat bergerak. EIEC menimbulkan penyakit melalui invasinya ke sel epitel mukosa usus (Kusuma, 2010).

d. *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC)

EHEC mampu membentuk A/E lesion seperti EPEC tetapi dibedakan karena EHEC menghasilkan toksin seperti shiga yaitu verotoksin. EHEC menyebabkan abnormalitas pada usus besar menyebabkan diare berair yang kemudian menjadi diare berdarah karena adanya ulserasi pada usus. EHEC mampu menginfeksi sistem urinari yang dikenal dengan *hemolytic-uremic syndrom* (HUS). HUS yang disebabkan EHEC melibatkan anemia hemolitik,

trombositopenia, dan gagal ginjal. EHEC dapat ditularkan lewat daging atau makanan yang terkontaminasi kotoran ternak. Salah satu strain EHEC yang terkenal yaitu O157: H7 (Welch, 2006).

e. *Enteraggregative Escherichia coli* (EAEC)

EAEC menyebabkan diare akut dan kronik dengan durasi >14 hari. Infeksi bakteri tersebut biasanya ditularkan melalui makanan (Hendrayati, 2012). Bakteri ini ditandai dengan pola khas pelekatnya pada sel manusia. EAEC memproduksi hemolisin dan ST enterotoksin yang sama dengan ETEC (Kususma, 2010).

2.2.2 Faktor Virulensi

Ada lima grup *E. coli* patogen yang telah diidentifikasi yaitu *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC), *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC), *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC), *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC), dan *Enteraggregative Escherichia coli* (EAEC). Masing-masing grup memiliki virulensi dan mekanisme patogenik yang berbeda serta inang yang spesifik (Marzuki, 2013). Faktor virulensi bakteri *E. coli* meliputi:

a. Antigen Permukaan

E. coli memiliki sedikitnya dua tipe fimbria, yaitu tipe manosa sensitive (pili) dan tipe manosa resisten *Colonization Factor Antigen* (CFA I dan CFA II) (Maksum, 2009). Kedua tipe fimbria ini penting sebagai sekumisasi, yaitu untuk perlekatan sel bakteri pada sel hospes. Antigen kapsul K-1 sering ditemukan pada *E. coli* yang diisolasi dari penderita bakteremia dan penderita meningitis. Antigen

K-1 berperan menghalangi proses fagositosis bakteri oleh leukosit (Maksum, 2009).

Toksin yang berhasil diisolasi dari *E. coli* adalah toksin LT dan ST. Produksi kedua jenis toksin ini diatur oleh plasmid. Plasmid dapat pindah dari satu sel bakteri ke sel bakteri yang lain. Bakteri *E. coli* memiliki dua jenis plasmid, yaitu plasmid yang menjadi pembentukan toksin LT dan ST dan plasmid yang menyandi pembentukan toksin ST saja (Maksum, 2009).

b. Enterotoksin

Enterotoksin yang berhasil diisolasi dari *E. coli* adalah toksin LT (*Labile toxin*) dan ST (*Stable toxin*). Produksi kedua jenis toksin ini diatur oleh plasmid. Plasmid dapat pindah dari satu sel bakteri ke sel bakteri yang lain. Bakteri *E. coli* memiliki dua jenis plasmid, yaitu plasmid yang menyandi pembentukan toksin LT dan ST dan plasmid yang menyandi pembentukan toksin ST saja. Toksin LT bekerja merangsang enzim adenilat siklase yang terdapat di dalam sel epitel mukosa usus, yang menyebabkan peningkatan permeabilitas sel epitel usus sehingga terjadi akumulasi cairan di dalam usus dan berakhir dengan diare. Toksin ST bekerja dengan mengaktifkan enzim guanilat siklase menghasilkan guanosin monofosfat siklik, menyebabkan gangguan absorpsi klorida dan natrium, serta menurunkan motilitas usus halus (Maksum, 2009).

c. Hemolisin

Hemolisin dikodekan oleh plasmid dan bersifat toksik terhadap sel pada biakan jaringan. Produksi hemolisin merupakan ciri khas dari strain *E. coli* yang diisolasi pada babi dan menyebabkan edema dan diare (Quinn *et al.*, 2002).

Hemolisin juga berfungsi meningkatkan kemampuan *E. coli* untuk bertahan hidup dalam aliran darah dengan mediasi resistensi terhadap fagositosis (Prihtiyantoro dkk., 2016).

d. Kapsular Lipopolisakarida (LPS)

Kapsular LPS diproduksi oleh beberapa strain *E. coli* berfungsi dengan mengganggu proses fagositik bakteri, dan mengganggu keefektifan antibakteri pada sistem komplemen (Quinn *et al.*, 2002). Kapsular LPS menyebabkan resistensi terhadap imunitas host selama proses infeksi, seperti antigen polisakarida K1 pada unggas (Wibowo dan Wahyuni, 2008).

e. Endotoksin

Endotoksin akan dilepaskan dari komponen LPS dinding sel pada saat bakteri mati. Peran LPS memiliki aktivitas pirogenik, menyebabkan kerusakan endotel, koagulasi intravaskular disemena, dan syok endotoksik (Quinn *et al.*, 2002).

f. Verotoksin (VT)

Verotoksin secara struktural, fungsional, dan antigenitas serupa dengan shiga toksin dari *Shigella dysenteriae*. Toksin VT merusak eritrosit dan sel endotel, serta dapat merusak sistem saraf pusat pada babi. Toksin VT menghambat sintesis protein pada sel eukariot dan menyebabkan kerusakan vaskular berupa edema, pendarahan, dan trombosis (Quinn *et al.*, 2002).

2.3 Kopi

2.3.1 Distribusi

Tanaman kopi (*Coffea* sp) merupakan tanaman perkebunan yang berasal dari daerah dataran tinggi yaitu negara Ethiopia pada abad ke-9, dari sana menyebar ke Mesir dan Yaman lalu di abad ke-15 menyebar ke Armenia, Persia, Turki, dan Afrika Utara. Kopi diperkenalkan di dunia pada abad ke-17 di India. Kemudian menyebar ke Benua Eropa oleh seorang yang berkebangsaan Belanda (Panggabean, 2011). Kopi masuk ke Indonesia pada abad ke-17 dibawa oleh bangsa Belanda yang pada saat itu sedang mengembangkan tanaman kopi di Jakarta dan kemudian meluas hampir ke seluruh wilayah Indonesia. Karena dukungan iklim yang sesuai, yaitu iklim tropis untuk pertumbuhan tanaman kopi (Ulung, 2014). Indonesia memiliki 3 jenis kopi yang dikembangkan, yaitu kopi arabika (*Coffea arabica*), kopi robusta (*Coffea robusta*), dan kopi liberika (*Coffea liberica*). Namun, pada umumnya penduduk Indonesia lebih banyak menanam kopi jenis robusta, sedangkan kopi arabika hanya ditanam berkisar 10 % (Herman, 2003).

Kopi robusta pertama kali ditemukan di Kongo pada tahun 1898 dan masuk ke Indonesia pada tahun 1900. Kopi robusta lebih mudah untuk bertahan hidup di dataran yang lebih rendah dibandingkan kopi arabika sehingga cocok untuk dibudidayakan di Indonesia. Saat ini lebih dari 90% dari areal pertanaman kopi Indonesia terdiri atas kopi robusta (Rahardjo, 2012). Berdasarkan wilayah budidayanya, pusat penghasil kopi robusta berada di Sumatera Selatan, Lampung,

Bengkulu, Jawa Timur, Jawa Tengah, Bali, Nusa Tenggara Timur, dan Nusa Tenggara Barat (Aklimawati dan Mawardi, 2014).

2.3.2 Taksonomi dan Deskripsi

Menurut *Integrated Taxonomic Information System* (2011), klasifikasi dari tanaman kopi robusta adalah sebagai berikut.



Kingdom	: Plantae
Divisi	: Tracheophyta
Subdivisi	: Spermatophyta
Infradivisi	: Angiospermae
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Gentianales
Famili	: Rubiaceae
Genus	: Coffea
Spesies	: <i>Coffea canephora</i>

Tanaman kopi mempunyai batang tegak, bercabang, dan tingginya bisa mencapai 12 meter. Kopi mempunyai sistem percabangan yang agak berbeda dengan tanaman lain. Tanaman ini mempunyai beberapa jenis cabang yang sifat dan fungsinya berbeda. Cabang yang tumbuhnya tegak dan lurus disebut cabang reproduksi. Cabang ini berasal dari tunas reproduksi yang terdapat di setiap ketiak daun pada cabang utama atau cabang primer (Suwanto dan Octavianty, 2010).

Tanaman kopi berbunga setelah berumur sekitar dua tahun. Bunga tersusun dalam kelompok, masing-masing terdiri dari 4-6 kuntum bunga. Pada setiap ketiak daun dapat menghasilkan 2-3 kelompok bunga. Bunga kopi

berukuran kecil, mahkotanya berwarna putih dan harum. Kelopak bunga berwarna hijau, dan benang sarinya terdiri dari 5-7 tangkai berukuran pendek. Kelopak dan mahkota akan membuka saat bunga telah dewasa. Kemudian bunga tersebut akan berkembang menjadi buah (Suwarto dan Octavianty, 2010).

2.3.3 Biji Buah Kopi

Buah muda berwarna hijau, kemudian kulitnya menguning dan menjadi merah tua (**Gambar 2.2.A**). Waktu yang diperlukan sejak terbentuknya bunga hingga buah menjadi matang sekitar 6-11 bulan, tergantung jenis dan faktor lingkungannya. Buah terdiri dari daging buah dan biji dengan diameter ± 5 mm terlihat pada (**Gambar 2.2.B**). Umumnya, buah kopi mengandung dua butir biji. Namun, ada juga yang berbiji satu atau sama sekali tidak berbiji karena bakal biji tidak berkembang sempurna. Lembaga (endosperm) merupakan bagian yang dimanfaatkan untuk membuat minuman kopi (Suwarto dan Octavianty, 2010).

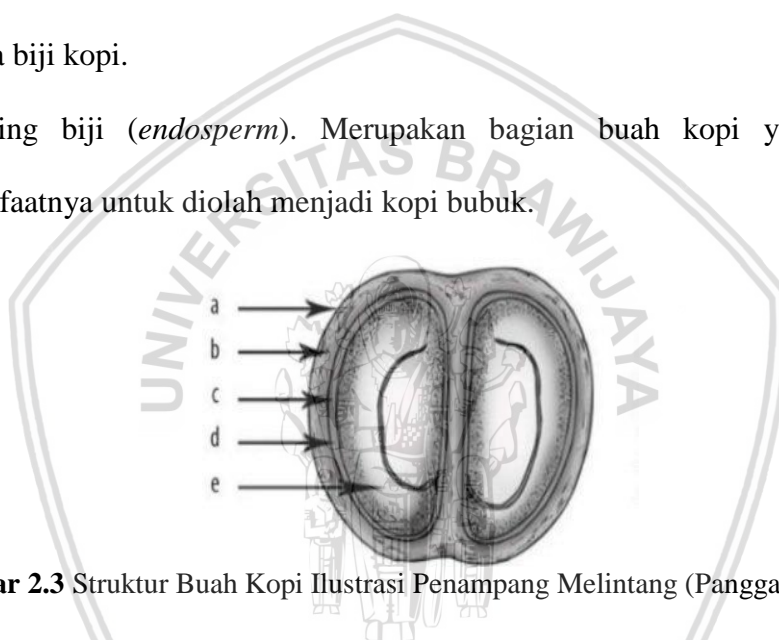


Gambar 2.2 Tanaman Kopi Robusta. A) Buah kopi robusta; B) Biji kopi robusta (Panggabean, 2011)

Menurut Goenawan (2011), buah kopi terdiri atas lima bagian seperti terlihat pada **Gambar 2.3**, yaitu :

- a. Lapisan kulit luar (*exocarp/epicarp*). Disebut juga dengan kulit buah, merupakan bagian terluar dari buah kopi.

- b. Lapisan daging (*mesocarp*). Disebut juga dengan daging buah, merupakan bagian yang berasa agak manis, dan mempunyai kandungan air yang cukup tinggi.
- c. Lapisan kulit tanduk (*endoscarp*). Merupakan lapisan kulit kopi paling keras, tersusun oleh selulosa dan hemiselulosa.
- d. Lapisan kulit ari (*spermoderm*). Merupakan kulit yang tipis dan menempel pada biji kopi.
- e. Keping biji (*endosperm*). Merupakan bagian buah kopi yang diambil manfaatnya untuk diolah menjadi kopi bubuk.



Gambar 2.3 Struktur Buah Kopi Ilustrasi Penampang Melintang (Panggabea, 2011)

2.3.4 Kandungan Senyawa Kimia

Komposisi kimia dari biji kopi bergantung pada spesies dan varietas dari kopi tersebut serta faktor lain yang berpengaruh antara lain lingkungan tempat tumbuh, tingkat kematangan dan kondisi penyimpanan (Panggabea, 2011).

Bagian tanaman kopi yang banyak dimanfaatkan oleh masyarakat ialah biji kopi. Karena dalam biji kopi terdapat banyak senyawa kimia, baik yang *volatile* maupun *nonvolatile*. Untuk senyawa kimia yang bersifat *nonvolatile* yang ada dalam biji kopi berupa air, karbohidrat, serat, protein, asam amino, lemak, mineral, asam organik, asam klorogenik, trigonelin dan kafein (**Tabel 2.1**) (Farah,

2012). Selain itu terdapat senyawa fenol, yang merupakan senyawa kimia yang mengandung senyawa hidroksil (-OH) yang mempunyai aktivitas antioksidan (Ariesta, 2013).

Tabel 2.1 Kandungan Senyawa Dalam Biji Kopi (Farah, 2012)

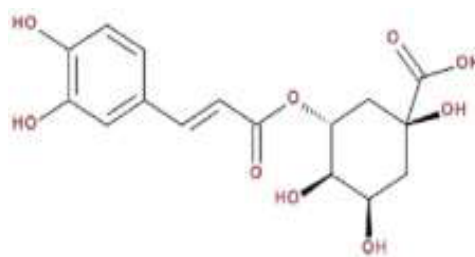
Komponen	Konsentrasi (gr/100 gr)			
	<i>Green Coffe</i>	<i>Roasted Coffea</i>	<i>Green Coffea</i>	<i>Roasted Coffea</i>
	<i>Arabica</i>	<i>Arabica</i>	<i>Robusta</i>	<i>Robusta</i>
Sukrosa	6.0 – 9.0	4.2	0.9 – 4.0	1.6
Gula pereduksi	0.1	0.3	0.4	0.3
Polisakarida	34.0 – 44.0	31.0 – 33.0	48.0 – 55.0	37.0
Lignin	3.0	3.0	3.0	3.0
Pectin	2.0	2.0	2.0	2.0
Protein	10.0 – 11.0	7.5 – 10.0	11.0 – 15.0	7.5 – 10.0
Asam Amino	0.5	ND	0.8 – 1.0	ND
Kafein	0.9 – 1.3	1.1 – 1.3	1.5 – 2.5	2.4 – 2.5
Trigoneline	0.6 – 2.0	1.2 – 0.2	0.6 – 0.7	0.7 – 0.3
Asam nikotinic	-	0.016 – 0.026	-	0.014 – 0.025
Minyak kopi	15.0 – 17.0	17.0	7.0 – 10.0	11.0
Diterpenes	0.5 – 1.2	0.9	0.2 – 0.8	0.2
Mineral	3.0 – 4.2	4.5	4.4 – 4.5	4.7
Asam klorogenat	4.1 – 7.9	1.9 – 2.5	6.1 – 11.3	3.3 – 3.8
Asam aliphatic	1.0	1.6	1.0	1.6
Asam quinic	0.4	0.8	0.4	1.0
Melanoidins	-	25.0	-	25.0

Kopi mengandung senyawa antioksidan yang berperan terhadap manfaat kesehatan, termasuk perlindungan dari berbagai penyakit, seperti penyakit jaringan lunak yang terjadi karena adanya invasi bakteri, virus, antigen, dan lain-lain. Senyawa antioksidan tersebut antara lain adalah kafein, fenol dan asam klorogenat (Winarsi 2007). Biji kopi robusta paling banyak mengandung asam

klorogenat dibandingkan dengan biji kopi lainnya (Farah, 2012). Namun, perbedaan kandungan asam klorogenat tidak hanya didasarkan pada jenis saja, adanya beberapa faktor seperti pemanasan atau penyangraian biji kopi hijau atau disebut juga “*roasted coffee*”. Selama proses pemanggangan atau penyangraian kopi terjadi perubahan secara fisik ataupun kimia, begitupun dengan kandungan di dalam biji kopi. Banyak penelitian yang melaporkan bahwa dengan dilakukannya proses penyangraian, asam klorogenat dapat terurai menjadi derivat fenol dan dapat menyebabkan nilai kandungannya menjadi berkurang didalam biji kopi tersebut (Moon *et al.*, 2009).

a. Asam Klorogenat

Asam klorogenat adalah suatu senyawa yang termasuk kedalam komponen fenolik, mempunyai sifat yang larut dalam air dan terbentuk dari esterifikasi asam quinic dan asam transcinamic tertentu seperti asam kafein, asam ferulic, dan asam pcoumaric. Subgrup utama dari isomer asam klorogenat pada kopi adalah asam *caffeoylquinic* (CQA), asam *feruloylquinic* (FQA), asam *dicafeoylquinic* (diCQA) dan asam *p-couma-roylquinic* (p-CQA) pada jumlah yang lebih kecil (Farah and Carmen, 2006). Berikut ini merupakan struktur kimiawi dari asam klorogenat (**Gambar 2.4**) adalah :



Gambar 2.4 Struktur Asam Klorogenat (Susan *et al.*, 2015)

Biji kopi adalah salah satu sumber asam klorogenat terbesar pada makanan yang dikonsumsi seperti pada biji kopi yang tidak disangrai (*green coffee*) mengandung asam klorogenat sebesar 6-12% (Farah and Carmen., 2006). Pada penelitian yang dilakukan oleh Leonardis *et al* (2008) mengenai potensi asam klorogenat dan metabolitnya sebagai antioksidan, ditemukan bahwa asam klorogenat memiliki aktivitas antioksidan yang paling kuat dibandingkan dengan metabolitnya ketika ditambahkan pada minyak hati ikan cod. Asam klorogenat selain sebagai antioksidan juga dapat berfungsi sebagai antivirus, antibakteri, antifungi, dan tidak menyebabkan resistensi antimikroba (Farah *et al.*, 2008). Bekerja dengan cara merusak dinding sel bakteri melalui perbedaan kepolaran antara lipid penyusun DNA dengan gugus alkohol sehingga dinding sel akan rusak dan senyawa tersebut dapat masuk ke dalam inti sel bakteri (Yaqin dan Nurmilawati, 2015).

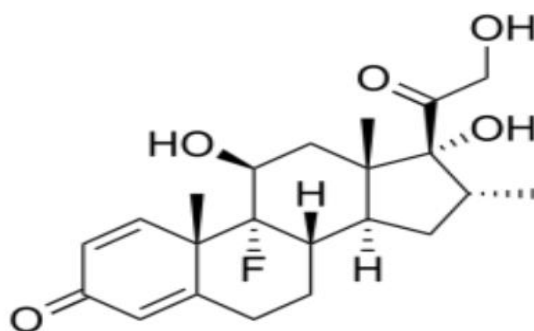
Asam klorogenat mampu melawan radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh dengan cara mempertahankan struktur normal sel dan fungsinya. Asam klorogenat bekerja dengan cara masuk ke dalam agen asing dan merusak struktur dinding agen asing tersebut. Mengonsumsi kopi sebagai antioksidan dalam jumlah memadai dilaporkan dapat menurunkan kejadian penyakit degeneratif, seperti kardiovaskuler, kanker, aterosklerosis, osteoporosis, dan lain-lain. Konsumsi makanan yang mengandung antioksidan juga dapat meningkatkan status imunologis dan menghambat timbulnya penyakit degeneratif (Winarsi, 2007).

Senyawa CGA mampu dengan menghambat modulasi sitokin proinflamasi IL-8, IL-6, IL-1 β , dan TNF- α . Penghambatan sitokin proinflamasi akan menghambat infiltrasi neutrofil dan makrofag. Sel radang yang tidak teraktivasi akan menurunkan produksi radikal bebas dan mengurangi kesusakan sel (Liang *and* Kitts, 2015).

2.4 Deksametason

Deksametason merupakan salah satu obat kortikosteroid yang masuk ke dalam kelompok glukokortikoid sintetik yang memiliki efek antiinflamasi dan immunosupresif, yang mana hal tersebut mendorong semakin dikembangkannya berbagai steroid sintetik dengan aktivitas antiinflamasi dan immunosupresif (Katzung *et al.*, 2013). Kortikosteroid merupakan obat antiinflamasi yang serupa dengan kortisol. Kortisol merupakan hormon steroid alami pada manusia yang disintesis dan disekresi oleh korteks adrenal. Efek antiinflamasi dari obat kortikosteroid dapat pula berpengaruh terhadap sel imunokompeten seperti sel T, makrofag, sel dendritik, eosinofil, neutrofil dan sel mast yang bekerja dengan menghambat respons inflamasi dan menyebabkan apoptosis dari berbagai sel tersebut (Smoak *and* Cidlowski, 2008).

Deksametason memiliki nama bangun yaitu *9-Fluoro-11 β ,17,21-trihidroksi-16 α -metilpregna-1,4-dien-3,20-dion*. Formula molekul dari deksametason (**Gambar 2.5**) adalah C₂₂H₂₉FO₅ dan memiliki berat molekul 392,47 g/mol (Murphy *et al.*, 2011).



Gambar 2.5 Rumus Molekul Deksametason (Murphy *et al.*, 2011)

Deksametason sebagai antiinflamasi glukokortikoid bekerja dengan hambatan aktivitas dari enzim fosfolipase A₂ sehingga senyawa arakhidonat tidak terbentuk pada jalur setelahnya tidak terjadi adanya metabolisme arakhidonat melalui jalur COX yang menghasilkan prostaglandin, tromboksan A₂ dan prostasiklin serta jalur LOX yang menghasilkan leukotrien (Waldron *et al.*, 2012).

Pada banyak penelitian dan kondisi klinis, deksametason mampu mencegah atau mengurangi proses inflamasi, pelepasan histamin, protease sel mast, myeloperoxidase leukotriens, PAF dan bermacam-macam prostaglandin. Deksametason dapat mendepresi sitem imun (*immunosupressan*) yaitu menghambat proliferasi dari sel leukosit terutama limfosit sehingga antibodi (immunoglobulin) tidak diproduksi (Murphy *et al.*, 2011). Menurut Katzung and Trevor (2007) glukokortikoid juga menghambat fungsi makrofag dan *antigen precenting cell* (APC) lain. Pemberian glukokortikoid menyebabkan penurunan fungsi sel dalam menanggapi antigen dan mirogen. Pada makrofag efek utama yaitu penurunan fungsi fagositosis dan penurunan sintesis *tumor necrosis factor* (TNF), *Interleukin (IL)-1*, *metalloproteinase*, dan *activator plasminogen*.

2.5 Hewan coba

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) merupakan hewan yang umum digunakan dalam penelitian, karena mudah dipelihara, secara garis besar fungsi dan bentuk organ serta proses biokimianya antara tikus dan manusia memiliki banyak kesamaan (Suckow, 2006). Tikus putih (*Rattus norvegicus*) digunakan sebagai hewan model intoksikasi dikarenakan memiliki kadar asam amino dan sistem metabolismenya yang hampir sama dengan manusia sehingga memudahkan dalam melakukan penelitian (Miller *et al*, 2010).

Tikus galur wistar merupakan hewan yang sering dipergunakan dalam berbagai penelitian, termasuk penelitian hormon dan pengamatan tingkah laku kopulasi yang berkaitan dengan libido. *Rattus norvegicus* ini memiliki ciri antara lain rambut tubuh berwarna putih dan mata yang merah, panjang tubuh total 440 mm, panjang ekor 205 mm dan bobot pada usia dewasa adalah sekitar 250-500 gram yang dapat dilihat pada **Gambar 2.6** (Suckow, 2006).



Gambar 2.6 Hewan Coba Tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Sirois, 2005)

Sistem klasifikasi *Rattus norvegicus* menurut Sirois (2005) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Subfilum	: Vertebrae
Kelas	: Mammalia
Subkelas	: Theria
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Pada penelitian dari Astawan dkk (2011), hewan coba tikus putih akan diinduksi dengan *E. coli* untuk mendapatkan model gastroenteritis. Infeksi *E. coli* diberikan secara peroral dengan menggunakan sonde yang diberi perlakuan selama 7 hari.

2.6 Jejunum

Usus kosong atau jejunum adalah bagian kedua dari usus halus, di antara usus dua belas jari (duodenum) dan usus penyerapan (ileum). Penggantung dari jejunum dan ileum adalah mesenterium. Permukaan dalam usus kosong berupa membran mukus dan terdapat jonjot usus (vili), yang memperluas permukaan dari usus. Secara histologis pula dapat dibedakan dengan usus penyerapan, yakni sedikitnya sel goblet. Fungsi utama dari usus halus adalah digesti enzimatik dan mengabsorpsi nutrisi. Usus halus memiliki epitel khusus yang mempunyai daerah permukaan yang luas. Struktur seperti vili pada mukosa dapat mengoptimalkan absorpsi. Vili ditutupi oleh sel absorptif (enterosit) yang tersusun erat, masing-

masing memiliki mikrovili pada permukaan lumen sepanjang membran plasma. Keberadaan mikrovili akan meningkatkan luas permukaan (Samuelson, 2007).

Panjang rata-rata duodenum, jejunum, dan ileum pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) dewasa adalah 10 cm, 100 cm, dan 3 cm. Jumlah vili pada usus menurun seiring dengan pertambahan umur, terutama pada umur 21-35 hari. Ukuran vili juga mengalami penurunan dari duodenum ke ileum (Sharp and Villano, 2013).

Gambaran histologi jejunum normal dapat terlihat dari tunika mukosa dengan vili yang berbentuk panjang dan tipis (Peckham, 2014). Jejunum memiliki 4 lapisan, yaitu tunika mukosa, tunika submukosa, tunika muskularis, dan tunika serosa. Mukosa dan submukosa pada usus halus memproyeksikan bentuk lipatan yang berbeda disebut plika, yang mengelilingi atau spiral di sekitar lingkaran bagian dalam dan terbentuk baik di jejunum. Di setiap lipatan mukosa terdapat bentukan yang menutupi dengan struktur rapat disebut vili. Pada bagian longitudinal terdapat dua lapisan muskularis yang jelas dapat dibedakan. Lapisan dalam otot polos mengelilingi submukosa, lapisan luar memanjang hanya di dalam serosa pada bagian luar usus. Susunan dari otot polos mempersiapkan untuk gerakan peristaltik usus yang kuat (Junqueira, 2010).

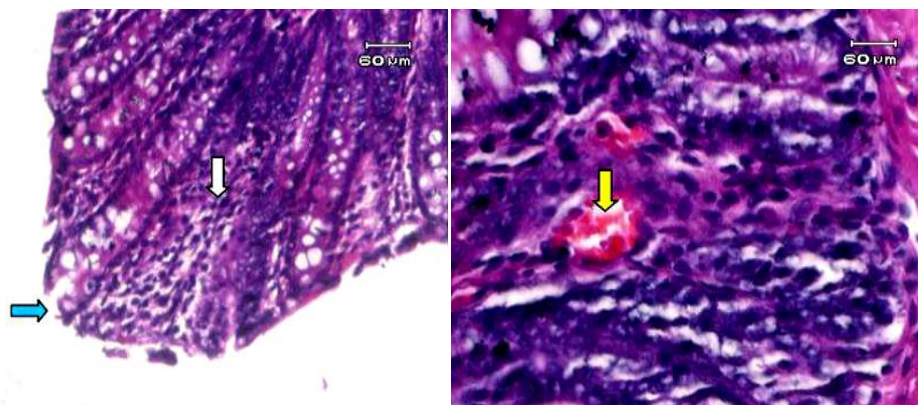
Vili tersusun atas kumpulan sel epitel silindris selapis yang berjajar dan jaringan ikat longgar lamina propria. Mikrovili sel epitel berfungsi untuk menyerap nutrisi. Sel epitel vili mengandung filamen aktin dan miosin yang berfungsi untuk pergerakan mikrovili, serta mengandung jaringan terminal sebagai reseptor perlekatan mikroba (Inamoto *et al*, 2008). Pada gambaran

histologi jejunum normal mukosa dengan vili yang tersusun rapat, sel epitel kolumnar, lapisan submukosa, lapisan muskuler, dan lapisan serosa (Zhang *et al.*, 2015). Pada **Gambar 2.7** ditunjukkan organ jejunum dalam keadaan normal.



Gambar 2.7 Histotologi jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan pewarnaan HE a) lapisan mukosa; b) lapisan submukosa; c) lapisan muskularis; d) lapisan serosa; e) struktur vili utuh; f) sel epitel normal; g) sel goblet normal (Zhang *et al.*, 2015).

Escherichia coli yang bersifat patogen yang menempel pada lapisan mukosa dapat menyebabkan erosi sel-sel epitel permukaan dan peradangan usus halus (Towoliu dkk, 2013). Inflamasi pada jejunum ditandai dengan adanya edema, infiltrasi sel-sel inflamasi seperti neutrofil, basofil, dan eosinofil, serta kerusakan vili dan epitel (Mitchel and Cotran, 2003). Pada **Gambar 2.8** adalah keadaan organ jejunum yang diinduksi *E. coli*.



Gambar 2.8 Histopatologi organ jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi *E. coli*. Terlihat epitel silindris mengalami erosi (panah biru), limfosit yang banyak (panah putih) menandakan adanya peradangan, dan pelebaran pembuluh darah kapiler (panah kuning) (perbesaran 200x dan 400x) (Towoliu dkk, 2013)

2.7 Transforming Growth Factor Beta (TGF- β)

Transforming Growth Factor Beta merupakan salah satu sitokin yang berperan penting dalam proses penyembuhan luka. Pada kondisi terjadinya luka, sel yang berperan adalah platelet, fibroblas dan monosit. *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β) terlibat dalam banyak proses seluler baik pada organisme dewasa maupun embrio yang sedang berkembang termasuk pertumbuhan sel, diferensiasi sel, apoptosis, homeostasis seluler dan fungsi seluler lainnya (Mauviel, 2009).

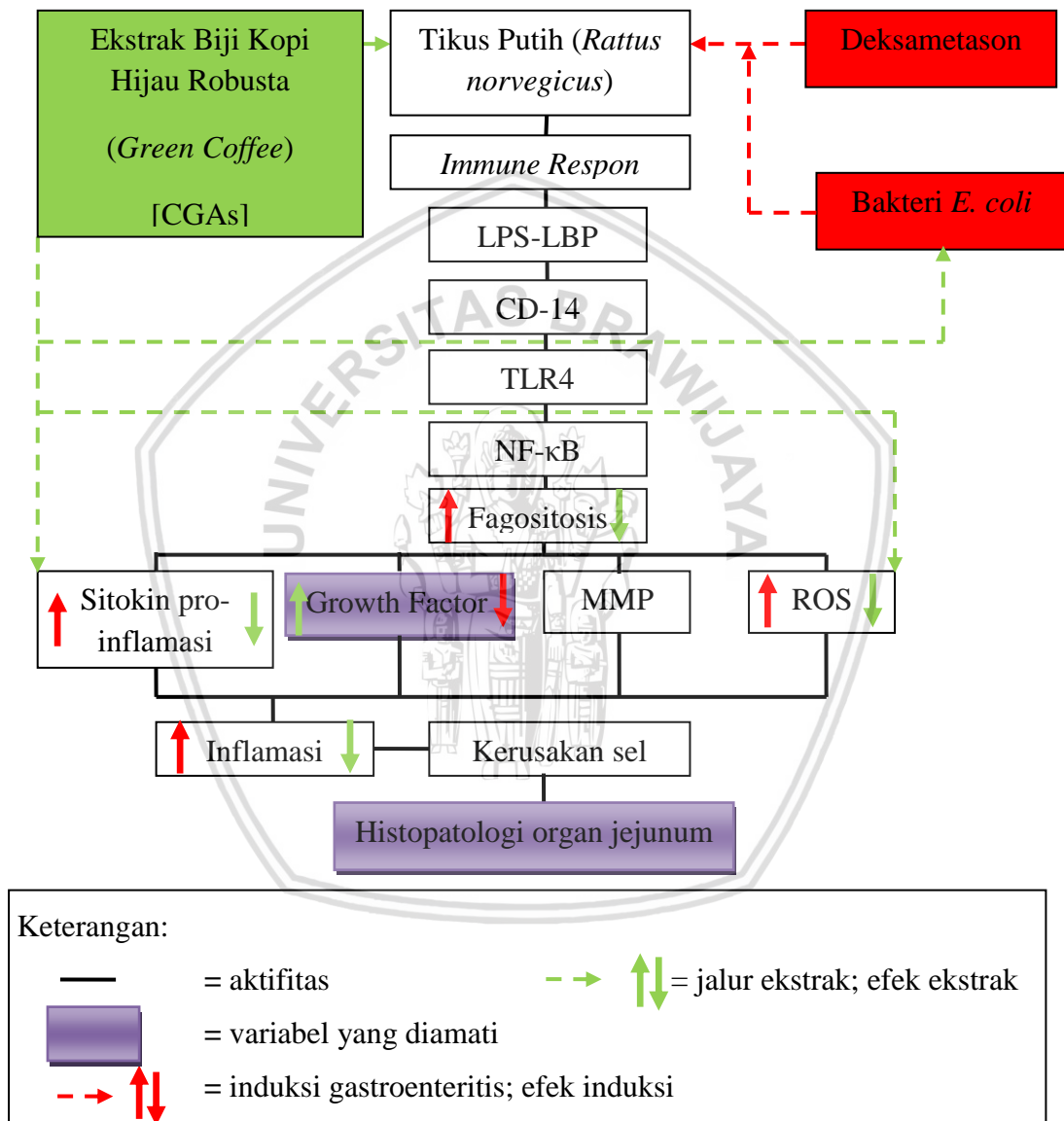
Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) terdiri dari tiga isoform antara lainnya, yaitu TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3. Ketiga isoform tersebut diekspresikan melalui ribosom yang melepaskan dalam bentuk proprotein dan diubah didalam aparatus golgi menjadi TGF- β ligan aktif yang akan berikatan dengan TGF- β reseptor yang terdiri dari reseptor tipe I dan reseptor tipe II (Faler *et al.*, 2006). Ligan superfamily TGF-B1 mengikat reseptor TGF- β tipe II, yakni serin/kinin

reseptor kinase, dan akan memfosforilasi reseptor TGF- β tipe I (Pakyari *et al.*, 2013).

Menurut Trihono (2011), TGF- β mempunyai tiga aktivitas biologik terpenting yaitu dampak biologik terhadap proliferasi sel, matriks ekstraseluler, dan efek immunosupresif. TGF- β mempunyai dua dampak terhadap proliferasi sel, yaitu inhibisi dan stimulasi. Selain itu, TGF- β berperan sebagai immunosupresor utama yang berhubungan dengan autoimun, inflamasi, dan kanker. TGF- β juga menstimulasi produksi beberapa faktor pertumbuhan (*growth factor*) seperti *basis fibroblast growth factor* (bFGF) dan *platelet derived growth factor* (PDGF) yang juga menstimulasi pembentukan protein matriks ekstraseluler. Dampak immunosupresif TGF- β berupa penghambatan proliferasi sel *thymocytes*, sel limfosit T dan limfosit B, sehingga berakibat penurunan produksi imunoglobulin. Sebaliknya, TGF- β meningkatkan sekresi imunoglobulin A dari mukosa. Selain itu TGF- β juga menghambat aktivitas sel *natural killer* (NK) dan menghambat produksi (namun tidak menghambat aktivitas) sel T sitotoksik.

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Hewan coba berupa tikus putih model gastroenteritis dibuat dengan cara menginjeksi tikus dengan deksametason dan diinfeksi *E. coli* menggunakan sonde lambung. Deksametason termasuk golongan kortikosteroid yang mengakibatkan penurunan fungsi sel dalam menanggapi antigen pada hewan coba dan menghambat fungsi makrofag. Pada kondisi gastroenteritis yang diinfeksi *E. coli* akan terjadi kerusakan dalam usus halus dan beberapa organ lainnya, seperti ginjal, hati yang penyebarannya melalui sistem pembuluh darah.

Bakteri *E. coli* akan berikatan dengan sel epitel yang diperantarai oleh *adhesin intimin* pada fimbriae dan replikasi kemudian membentuk mikrokoloni pada mukosa usus. Perlekatan *Escherichia coli* dengan sel hospes menyebabkan aktivasi dari *type III secretion system* (T3SS) yang kemudian akan mentranslokasikan protein efektor *translocated intimin receptor* (Tir) ke sel hospes dan menyebabkan terbentuknya lesi A/E.

E. coli juga menghasilkan endotoksin berupa Lipopolisakarida (LPS) dan dilepaskan pada saat bakteri mengalami lisis. LPS dilepaskan saat bakteri mengalami lisis sehingga merangsang sistem pertahanan tubuh dan terjadi proses fagositosis oleh makrofag. Lipopolisakarida yang telah lisis dapat merusak epitel saluran pencernaan dan dapat memasuki aliran pembuluh darah. *Lipopolisakarida Binding Protein* (LBP) merupakan suatu protein fase akut yang disintesis oleh hepatosit yang dianggap sebagai tanda adanya endotoksin dalam darah. Kompleks LPS-LBP kemudian akan mentransfer LPS pada reseptor CD14 yang terdapat di permukaan makrofag. Setelah berikatan dengan LPS, CD14 berinteraksi dengan *toll like receptor* (TLR4) sehingga menyebabkan aktivasi dari *nuclear factor*

kappa-B (NF- κ B). Aktivasi NF- κ B akan memicu aktivasi fagositosis makrofag. NF- κ B merupakan faktor transkrip pada makrofag yang akan meningkatkan produksi dari sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α dan akan menghasilkan efek yang merusak jaringan saat terjadi gastroenteritis. Sel Th2 mensekresikan sitokin antiinflamasi yaitu TGF- β yang memiliki efek supresi sel-sel imun mencakup deaktivasi dalam produksi makrofag dan menghambat proliferasi Th1.

Radikal bebas yang terjadi akibat aktivitas fagositosis akan membentuk ROS (*Reactive Oxygen Species*) untuk membunuh bakteri yang masuk. Peningkatan produksi ROS di organ atau sel-sel yang menyusun organ seperti jejunum akan mengakibatkan peningkatan stress oksidatif. Senyawa oksigen reaktif yang berinteraksi dengan lipid bilayer pada membran sel akan menghasilkan peroksidasi lipid pada jejunum yang akan mengakibatkan hilangnya fungsi seluler.

Pemberian ekstrak biji kopi hijau robusta (*green coffee*) yang mengandung asam klorogenat diharapkan memberikan efek antibakteri (menginaktivasi adhesi sel mikroba sehingga bakteri tidak dapat melakukan perlekatan pada epitel usus halus), antiinflamasi (mengatur penurunan sitokin pro-inflamasi, melalui modulator dari faktor transkripsi) dan antioksidan (bekerja dengan menghambat radikal bebas). Senyawa CGA mampu menghambat modulasi sitokin proinflamasi IL-8, IL-6, IL-1 β , dan TNF- α , sehingga menghambat infiltrasi neutrofil dan makrofag. Sel radang yang teraktivasi dengan jumlah sedikit akan menurunkan produksi radikal bebas dan mengurangi kesusakan sel (Liang *and* Kitts, 2015). Penurunan stres oksidatif menyebabkan ROS ikut menurun yang mengakibatkan

NF- κ B mengalami deaktivasi, sehingga terjadi penurunan ekspresi sitokin pro-inflamasi TNF- α yang akan diimbangi dengan peningkatan perbaikan dan integritas jaringan jejunum. Adanya peningkatan sitokin antiinflamasi TGF- β , akan menghambat regulasi sitokin proinflamasi dan menurunkan aktivitas neutrofil sehingga kerusakan jaringan dapat dihambat (Liang *and* Kitts, 2015). TGF- β yang meningkat memicu integrin dalam mengontrol reaksi perbaikan jaringan melalui produksi kolagen, matriks ekstraseluler dan fibroblas sehingga mengurangi inflamasi pada organ jejunum dan terjadi pembentukan jaringan ikat yang baru.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep yang telah didapatkan dalam penjelasan, hipotesa penelitian sebagai berikut ini:

1. Pemberian ekstrak *green coffee* dapat meningkatkan ekspresi TGF- β pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) model gastroenteritis yang diinfeksi *E. coli*.
2. Pemberian ekstrak *green coffee* dapat memperbaiki kerusakan jaringan jejunum pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) model gastroenteritis yang diinfeksi *E. coli*.

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di UPT. Materia Medika Batu, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Patologi Anatomi Kessima Medika Malang. Waktu pelaksanaan penelitian pada bulan September - November 2017.

4.2 Alat dan Bahan

4.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lainnya, yaitu bak tempat pemeliharaan tikus, wadah makan dan minum tikus, cawan petri, sonde lambung, timbangan, gelas ukur, tabung erlenmeyer, mikropipet, *vortex*, autoclave, ose bulat, bunsen, inkubator, tabung falcon, *beaker glass*, *refrigerator*, tabung rak, mikroskop, objek glass, cover glass, spuit, *dissecting set*, plastik klip, gabus dan pot organ.

4.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lainnya, yaitu tikus putih berjenis kelamin jantan, bakteri *E. coli*, biji kopi hijau, deksametason, makanan dan minuman tikus, akuades, hidrobat steril, formalin 10%, minyak emersi, kristal violet, pewarna *Hematoxylen-Eosin*, parafin, larutan *Phospate Buffer Saline-Azida* (PBS), xylol, alkohol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 90%,

96%), etanol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%), H_2O_2 , *Bovine Serum Albumin* (BSA), antibodi primer *anti rat TGF- β* , *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SAHRP), *Mayer Hematoxylen*, DAB kromagen, media *Nutrient Agar Plate* (NAP), media *Eosin Methylen Blue Agar* (EMBA).

4.3 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus putih (*Rattus novergicus*) berjenis kelamin jantan. Hewan coba diaklimasikan selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Hewan coba diharuskan memiliki kondisi sehat, lulus proses sertifikasi etik penelitian oleh Komisi Etik Penelitian, dan belum pernah digunakan penelitian. Sedangkan untuk biji kopi hijau yang dipakai berasal dari daerah Lampung.

Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus Fereder (Kusriningrum, 2008) adalah :

$t(n-1)$	≥ 15	Keterangan :
$5(n-1)$	≥ 15	t = jumlah kelompok perlakuan
$5n-5$	≥ 15	n = jumlah ulangan yang diperlukan
$5n$	≥ 20	
n	$\geq 20/5$	
n	≥ 4	

Berdasarkan perhitungan diatas, maka untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah tikus putih (*Rattus novergicus*) sebanyak 4 ekor

dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan total 20 ekor tikus sebagai hewan coba.

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan Acak Lengkap digunakan apabila ragam satuan percobaan yang digunakan homogen atau seragam. Kelompok penelitian ditunjukkan dalam **Tabel 4.1** sebagai berikut :

Tabel 4.1 Rancangan Kelompok Penelitian

Kelompok	Keterangan
(Kontrol negatif)	Kelompok sehat, tikus jantan berjumlah 4 ekor, hanya diberikan makan dan minum secara <i>ad libitum</i> selama 31 hari, dan pada hari ke 32 dilakukan nekropsi
(Kontrol positif)	Kelompok sakit, tikus jantan berjumlah 4 ekor, diberikan makan dan minum secara <i>ad libitum</i> selama 31 hari, tanpa diberi ekstrak <i>green coffee</i> , diberikan deksametason dengan dosis 5 mg/kgBB <i>b.d.d</i> secara IP pada hari 22-24 (selama 3 hari), diinduksi <i>E. coli</i> pada hari ke 25-31 (selama 7 hari) dan pada hari ke 32 dilakukan nekropsi
P1 (Perlakuan 1)	Tikus jantan berjumlah 4 ekor, diberikan makan dan minum secara <i>ad libitum</i> selama 31 hari, diberikan ekstrak <i>green coffee</i> dengan dosis 500 mg/kgBB pada hari ke 8-31, diberikan deksametason dengan dosis 5 mg/kgBB <i>b.d.d</i>

	secara IP pada hari 22-24 (selama 3 hari), diinduksi <i>E. coli</i> pada hari ke 25-31 (selama 7 hari) dan pada hari ke 32 dilakukan nekropsi
P2 (Perlakuan 2)	Tikus jantan berjumlah 4 ekor, diberikan makan dan minum secara <i>ad libitum</i> selama 31 hari, diberikan ekstrak <i>green coffee</i> dengan dosis 1000 mg/kgBB pada hari ke 8-31, diberikan deksametason dengan dosis 5 mg/kgBB <i>b.d.d</i> secara IP pada hari 22-24 (selama 3 hari), diinduksi <i>E. coli</i> pada hari ke 25-31 (selama 7 hari) dan pada hari ke 32 dilakukan nekropsi
P3 (Perlakuan 3)	Tikus jantan berjumlah 4 ekor, diberikan makan dan minum secara <i>ad libitum</i> selama 31 hari, diberikan ekstrak <i>green coffee</i> dengan dosis 1500 mg/kgBB pada hari ke 8-31, diberikan deksametason dengan dosis 5 mg/kgBB <i>b.d.d</i> secara IP pada hari 22-24 (selama 3 hari), diinduksi <i>E. coli</i> pada hari ke 25-31 (selama 7 hari) dan pada hari ke 32 dilakukan nekropsi

4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang dapat diamati dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas : Ekstrak *green coffee* dan bakteri *E. coli*

Variabel terikat : Ekspresi TGF- β dan histopatolgi jejunum

Variabel kontrol : Homogenitas tikus putih (jenis kelamin, galur strain, berat badan, umur), pakan, air minum dan kandang

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Prosedur Pembuatan Ekstrak *Green Coffe (Coffea canephora)*

Pembuatan ekstrak biji kopi dilakukan dengan menumbuk biji kopi menjadi serbuk. Pembuatan ekstrak dilakukan menggunakan teknik maserasi. Serbuk *green coffee* ditimbang kemudian dibasahi dengan pelarut etanol 90%, kemudian serbuk yang telah dibasahi dengan pelarut dipindahkan ke dalam toples, diratakan dan ditambahkan pelarut etanol 90% sampai terendam. Toples ditutup dengan rapat selama 24 jam dan dishaker diatas shaker digital dengan kecepatan 50 rpm. Ekstrak cair disaring dengan penyaring kain dan hasilnya ditampung dalam erlenmeyer, ampas kemudian dimasukan lagi dalam toples dan ditambahkan pelarut sampai terendam, dibiarkan semalam atau 24 jam diatas shaker kecepatan 50 rpm. Hasil ekstrak cair pertama dan kedua dijadikan satu dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evapor* selama 4 jam. Kemudian ekstrak yang dihasilkan dievaporasi diatas *water bath* selama 2 jam (Haque *et al*, 2013).

4.6.2 Pembuatan Suspensi Bakteri

Uji konfirmasi *E. coli* dilakukan dengan menginokulasikan suspensi pada media *Eosin Methylen Blue Agar* (EMBA) secara aseptik dengan menggunakan ose. Koloni *E. coli* akan tumbuh berwarna hijau metalik. Pembuatan larutan standart 1 McFarland 1 dilakukan dengan menggunakan BaCl_2 dan H_2SO_4 .

Sebanyak 0,1 ml 1% BaCl₂ dicampurkan dengan 9,9 ml 1% H₂SO₄. Campuran kedua zat ini memiliki konsentrasi kekeruhan (turbiditas) setara dengan 3×10^8 CFU/ml (Mc Farland 1) (Sutton, 2011).

Suspensi bakteri dibuat dengan menggunakan media *Nurient Broth* (NB) yang disterilkan terlebih dahulu dengan autoclave 121°C selama 15 menit. Koloni bakteri yang telah teridentifikasi pada media EMBA diinokulasikan kembali pada media *Nutrient Agar* (NA) untuk perbanyakan. Kemudian *isolated colony* yang terpisah pada media NA diambil satu ose dan dimasukkan ke tabung reaksi berisi media NB sebanyak 5 mL kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Suspensi tersebut kemudian diencerkan menggunakan hidrobat steril sampai kekeruhannya setara dengan larutan standart McFarland 1 sehingga konsentrasi bakteri setara dengan 3×10^8 CFU/mL (Nuria dkk, 2010).

4.6.3 Pemberian Terapi Ekstrak *Green Coffee* (*Coffea canephora*)

Pemberian ekstrak kopi pada hewan coba diberikan secara per-oral pada kelompok P1, P2, dan P3 dengan dosis yaitu 50-250 mg/kgBB PO pada mencit (Haque *et al.*, 2013). Selanjutnya dikonversikan terlebih dahulu dosis dari mencit ke tikus. Sehingga didapatkan penetapan nilai rentan dosis pemberian ekstrak kopi pada tikus yaitu antara 350-1750 mg/kgBB. Pada penelitian ekstrak *green coffee* robusta diberikan pada kelompok P1 dengan dosis 500 mg/kgBB, kelompok P2 dengan dosis 1000 mg/kgBB, dan kelompok P3 dengan dosis 1500 mg/kgBB. Pemberian ekstrak diberikan selama 24 hari dan ekstrak diberikan satu kali sehari dengan cara menggunakan sonde lambung.

4.6.4 Pembuatan Hewan Model Gastroenteritis

A. Persiapan Hewan Coba

Hewan model yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar umur 8-12 minggu, dengan berat badan 150-200 gram (Astawan dkk, 2011). Tikus putih diadaptasi selama 7 hari untuk menyesuaikan dengan kondisi laboratorium. Kemudian tikus putih dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dimana setiap kelompok terdiri atas 4 ekor tikus.

Tikus ditempatkan dalam bak plastik tertutup kawat dengan ukuran 30cm x 50cm x 10cm yang beralaskan sekam padi agar kandang tersebut tidak lembab. Kandang ditempatkan pada area yang tenang/tidak bising dan terhindar dari asap industri maupun polutan lainnya. Semua tikus diberikan pakan secara teratur dan minum secara *ad libitum* (Lamanepa, 2005).

B. Pemberian Imunosupresan

Deksametason diberikan secara injeksi secara intraperitonial pada kelompok kontrol positif, P1, P2, dan P3. Dosis yang digunakan yaitu 5 mg/kgBB yang diberikan 2 kali sehari selama 3 hari (Sulaiman *et al.*, 2010). Pemberian deksametason dilakukan pada hari ke 22-24.

C. Infeksi *E. coli*

Bakteri *E. coli* yang diinduksi pada hewan coba yaitu dengan konsentrasi sebesar 10^8 CFU/ml. Menurut Astawan (2011), bakteri diberikan dengan dosis 1 ml per hari, dengan cara menggunakan sonde lambung selama 7 hari pada semua tikus putih kecuali kelompok tikus putih kontrol negatif.

4.6.5 Isolasi Organ Jejunum

Pengambilan organ jejunum pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) perlakuan 1, 2, 3, kontrol positif, dan kontrol negatif dilakukan pada hari ke 32. Menurut Jusuf (2009), tikus putih (*Rattus norvegicus*) didislokasi pada bagian *vertebrae cervicalis* dan dilakukan pembedahan. Pembedahan dilakukan pada rongga abdomen, tikus posisi rebah dorsal pada papan pembedahan. Diincisi mulai dari ventral *midline* abdomen, diincisi kulit, subkutan kemudian diincisi muskular daerah abdomen ke arah caudal, dicari organ jejunum. Organ jejunum kemudian dibilas dengan NaCl fisiologis 0,9% direndam dalam pot yang berisi larutan formalin 10%. Diberi label kemudian dilanjutkan pembuatan preparat histopatologi dengan pewarnaan HE dan pengukuran ekspresi TGF- β .

4.6.6 Pembuatan Preparat Histopatologi Jejunum dengan Pewarnaan Hematoxyline Eosin (HE)

Tahapan pembuatan preparat yaitu Fiksasi, Dehidrasi, Clearing, Infiltrasi, Embedding, dan Trimming (pemangkasan). Jaringan yang sudah dikoleksi diproses dengan fiksatif yang akan menjaga agar sediaan tidak akan rusak. Fiksatif yang digunakan adalah formalin 10%. Kemudian jaringan dipindahkan kedalam alkohol 70% sebagai stopping point. Kemudian dilakukan proses penarikan air dari jaringan (dehidrasi) menggunakan alkohol dengan konsentrasi bertingkat mulai 80% sampai dengan 100%. Lalu jaringan dijernihkan dengan xylol (clearing) dan ditanam dalam parafin (embedding). Blok parafin yang berisi organ diiris 6 μ m menggunakan mikrotom. Irisan ditempel pada kaca obyek menggunakan *Mayers albumin* dan dibiarkan selama 24 jam agar menempel kuat.

Tahapan pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE) dimulai dengan tahap deparafinasi yaitu dengan memasukkan preparat ke dalam xylol bertingkat I-III masing-masing selama 5 menit. Tujuannya untuk melarutkan parafin yang terdapat pada jaringan. Kemudian, dilakukan tahapan rehidrasi, yaitu preparat dimasukkan ke dalam alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%) masing-masing selama 5 menit, lalu direndam dalam aquades selama 5 menit, dibilas dengan aquades dan dimasukkan ke dalam pewarna *Eosin* selama 5 menit. Tujuannya untuk memberi warna merah pada sitoplasma sel. Selanjutnya, preparat direndam dalam aquades untuk menghilangkan pewarna *Eosin* yang menempel. Tahapan selanjutnya dilakukan dehidrasi dengan memasukkan preparat ke dalam alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%) yang bertujuan untuk menghilangkan air dari jaringan. Kemudian dilakukan *clearing* dengan memasukkan preparat pada xylol I-II dan dikeringkan. Selanjutnya dilakukan *mounting* dengan menggunakan *entellan* (Jusuf, 2009).

Pengamatan histopatologi jejunum dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya *Olympus* dengan perbesaran 100x dan 400x. Bagian yang diamati adalah lapisan mukosa serta tanda-tanda inflamasi seperti edema, infiltrasi sel radang, dan kerusakan mukosa serta epitel (Erben *et al.*, 2014).

4.6.7 Pengukuran Ekspresi TGF- β dengan Metode Imunohistokimia

Metode pewarnaan imunohistokimia dimulai dengan perendaman *slide* preparat pada *xylol 1*, *xylol 2*, dan etanol bertingkat (70%, 80%, 90%, 100%). Slide preparat lalu dicuci menggunakan PBS sebanyak 3 kali selanjutnya ditetesi dengan 3% H₂O₂ selama 20 menit. Selanjutnya, dicuci kembali dengan PBS

sebanyak 3 kali dan diblok dengan 1% *Bovine Serum Albumin* (BSA) selama 30 menit. *Slide* preparat dicuci kembali dengan PBS 3 kali dan diinkubasi dengan antibodi primer *anti rat TGF- β* selama semalam pada suhu 40°C, kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali. Preparat lalu diinkubasi dengan antibodi sekunder selama 1 jam dengan suhu ruang. Selanjutnya dicuci kembali dengan PBS sebanyak 3 kali. *Slide* preparat diberi *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SAHRP) selama 40 menit dan dicuci kembali menggunakan PBS sebanyak 3 kali. Ditetesi dengan kromagen selama 10 menit dan dicuci kembali dengan PBS sebanyak 3 kali. *Counterstaining* menggunakan *Mayer Hematoxylen* selama 5 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir kemudian dibilas dengan aquades dan dikeringkan. Preparat di *mounting* dengan entellan dan ditutup dengan cover glass (Jusuf, 2009).

Preparat diamati dengan mikroskop Olympus BX51 untuk menentukan hasil secara kualitatif ekspresi TGF- β . Preparat diamati dengan perbesaran 400x untuk melihat area jaringan yang menunjukkan ekspresi TGF- β . Dari seluruh luas jaringan, ditentukan lima lapang pandang area ekspresi TGF- β (Janquiera, 2007). Digital image diproses menggunakan aplikasi Immunorattio untuk menghitung luas area yang mengekspresikan TGF- β dalam presentase. Prinsip dari Immunorattio memisahkan area nukleus yang terwarnai DAB dan *hematoxylin* dari gambar mikroskop, kemudian menghitung persentase area yang terwarnai DAB dari area nuklear total dan menghasilkan gambar *pseudo-colored* yang sesuai dengan hasil segmentasi (pemisahan). Area yang terwarnai DAB tersebut

merupakan area yang terekspresikan (Tuominen, *et al.*, 2010). Proses yang telah dijelaskan di atas dapat dilihat secara rinci pada **Lampiran 4**.

4.6.8 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil perlakuan berupa ekspresi TGF- β diolah dengan menggunakan uji *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) dengan taraf kepercayaan sebesar 95% ($\alpha = 0,05$) yang dengan menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) untuk bisa mengetahui perbedaan rata-rata antar kelompok perlakuan atau perbedaan keseluruhan dari kelompok perlakuan. Apabila terdapat adanya perbedaan yang nyata diantara kelompok perlakuan, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) / uji *Tukey*. Gambaran histopatologi jejunum dengan pewarnaan HE menggunakan data kualitatif, yang akan dianalisis dan disajikan secara deskriptif dengan yang diamati adalah adanya erosi vili sel epitel, infiltrasi sel radang, dan kerusakan mukosa serta epitel.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Deteksi Asam Klorogenat

Kandungan dari senyawa asam klorogenat pada *green coffee* robusta dapat diidentifikasi dengan menggunakan metode *Liquid Chromatography-Mass Spectrofotometry* (LC-MS). LC-MS adalah teknik analisis kimia yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dari *Liquid Chromatography* (LC) dengan kemampuan analisis massa dari *Mass Spectrofotometry*. Pemisahan senyawa terjadi pada sistem LC menggunakan fase gerak berupa cairan yang terikat secara kimia pada penyangga halus (fase diam) dan berupa cairan (fase gerak) yang dipaksa mengalir dengan laju terkendali memakai tekanan yang tinggi. Setelah terjadi pemisahan, senyawa dalam larutan diubah menjadi gas dan dideteksi oleh detektor spektrometri massa (Michael and Christoph, 2008). Hasil identifikasi kandungan dari *green coffee* robusta dengan menggunakan metode LC-MS dapat dilihat pada **Lampiran 10**. Subgrup utama dari isomer asam klorogenat pada kopi adalah asam *caffeoylquinic* (CQA), asam *feruloylquinic* (FQA), asam *dicaffeoylquinic* (diCQA) dan asam *p-coumaroylquinic* (p-CQA) pada jumlah yang kecil (Farah dan Carmen, 2006).

5.2 Penelitian Pendahuluan

Pada penelitian sebelumnya tikus yang langsung diinfeksi *E. coli* tidak cepat menunjukkan kondisi diare (gastroenteritis), sehingga dilakukan penelitian pendahuluan selama 7 hari. Hewan coba tikus putih diberikan ekstrak *green coffee*

robusta satu kali sehari dengan cara sonde lambung setiap harinya. Pada hari ketiga, tikus putih terlebih dahulu diinjeksi *immunosupressan* dengan menggunakan deksametason dosis 5 mg/kgBB diberikan 2x sehari selama 3 hari. Deksametason bekerja dengan menurunkan respon imun tubuh terhadap stimulasi rangsangan yaitu dengan menghambat sekresi sitokin IFN- γ dan TNF- α sehingga menyebabkan *down-regulation* dari sel T. Pada hari keempat tikus putih kemudian diinduksi dengan *E. coli* patogen menggunakan sonde lambung sebanyak 1 mL dengan konsentrasi 10^8 CFU/mL selama berturut-turut sampai dengan hari ketujuh. Hasil yang didapatkan tikus percobaan tersebut mengalami diare dengan ditandai kondisi feses yang berlendir dan berwarna agak kecoklatan.

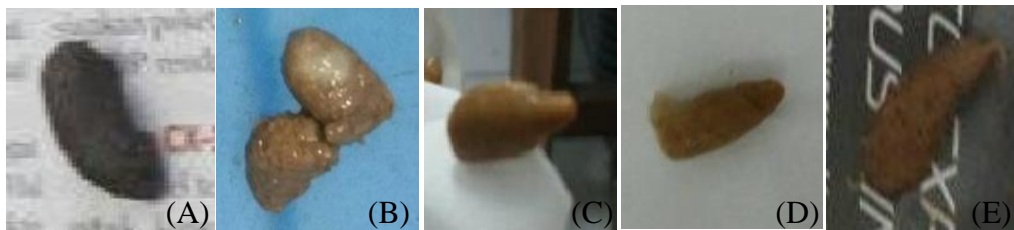
5.3 Hewan Coba Model Gastroenteritis Hasil Infeksi *Escherichia coli*

Gastroenteritis merupakan kondisi adanya inflamasi pada membran mukosa saluran pencernaan yang ditandai dengan keadaan muntah dan diare. Kondisi diare ditinjau dari dengan keadaan dari feses. Salah satu penyebab yang menimbulkan gastroenteritis adalah adanya infeksi golongan bakteri, yaitu *E. coli*. Bakteri *E. coli* merupakan salah satu bakteri patogen yang dapat menyebabkan kondisi diare. Perlekatan *E. coli* pada sel mukosa usus menyebabkan terjadinya perubahan struktur sel kemudian *E. coli* melakukan invasi menembus sel epitel usus (Astawan dkk., 2011). Keadaan tersebut menimbulkan gangguan fungsi peristaltik dan sekresi usus meningkat, tetapi fungsi absorsi usus menurun sehingga menimbulkan keadaan diare (Suraatmaja, 2005).

Menurut Astawan, dkk (2012) mengatakan bahwa kriteria diare pada tikus dibagi menjadi lima kategori, yaitu: (1) Tanda feses normal yaitu feses berbentuk bulat atau lonjong, berwarna hitam, dan keras, (2) Tanda diare skor 1 yaitu feses berbentuk bulat atau lonjong, berwarna hitam, dan agak lembek, (3) Tanda diare skor 2 yaitu feses berbentuk bulat atau lonjong, berwarna hitam, dan lembek, (4) Tanda diare skor 3 yaitu feses tidak berbentuk bulat maupun lonjong, berwarna agak kecoklatan, sangat lembek, hingga muncul lendir, (5) Tanda diare skor 4 yaitu feses cair, tidak berbentuk, berwarna coklat, hingga muncul lendir. Kondisi feses yang dinyatakan diare adalah feses dengan tanda diare skor 3 dan 4, sedangkan feses dengan tanda diare skor 1 dan 2 masih dinyatakan feses normal.

Pada penelitian ini dilakukan pada 5 kelompok perlakuan yang terdiri atas, kelompok kontrol negatif (tikus sehat), kelompok kontrol positif (tikus diare), dan 3 kelompok perlakuan diberikan ekstrak *green coffee* robusta dengan dosis masing-masing 500 mg/kgBB, 1000 mg/kgBB, dan 1500 mg/kgBB. Hasil penelitian didapatkan bahwa tikus yang berada dalam kelompok kontrol positif, konsistensi fesesnya berubah menjadi lembek dan berlendir (lunak dan berair) dibandingkan dengan kelompok lainnya. Pada tikus P1 memiliki feses dengan konsistensi lembek yang berbeda dengan kontrol positif yang memiliki feses dengan konsistensi lembek dan berlendir. Pada tikus P2 memiliki feses dengan konsistensi agak lembek, sedangkan tikus P3 memiliki konsistensi feses yang tidak terlalu keras dan menyerupai feses pada kontrol negatif yang memiliki konsistensi solid dapat dilihat pada **Gambar 5.1** dibawah ini. Selain ditinjau dari

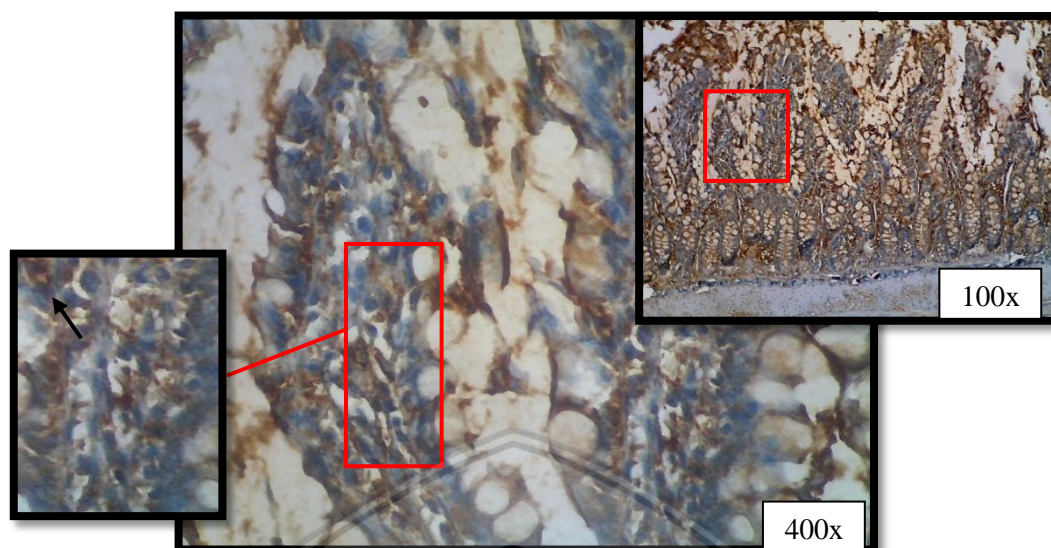
fesesnya, tikus yang diinfeksi dengan *E. coli* menunjukkan nafsu makan menurun dan kurang aktif bergerak.



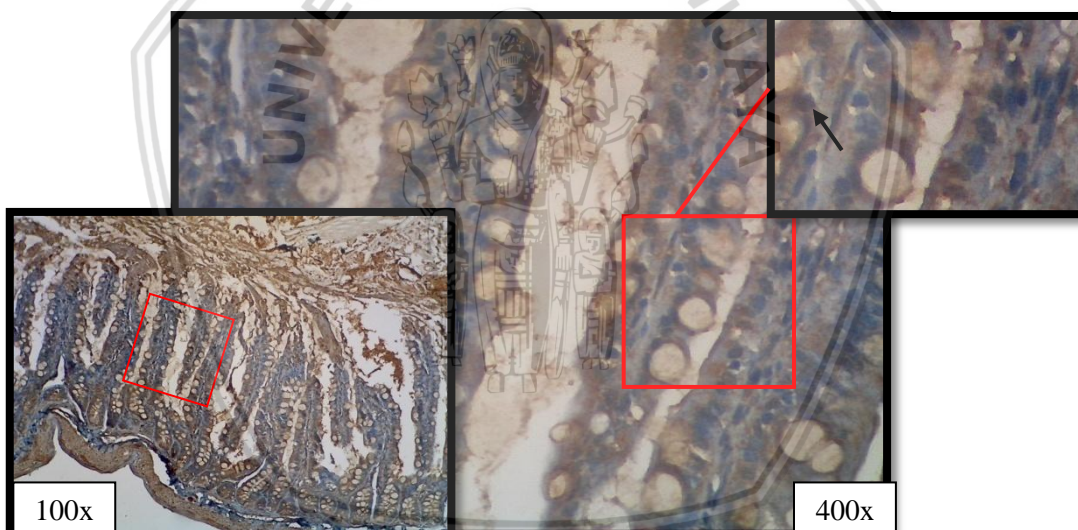
Gambar 5.1 Feses Tikus Putih Penelitian. (A) Feses tikus kontrol negatif; (B) Feses tikus kontrol positif; (C) Feses tikus P1 dosis 500 mg/kgBB; (D) Feses tikus P2 dosis 1000 mg/kgBB; (E) Feses P3 dosis 1500 mg/kgBB.

5.4 Pengaruh Preventif Ekstrak *Green Coffee (Coffea canephora)* terhadap Ekspresi TGF- β

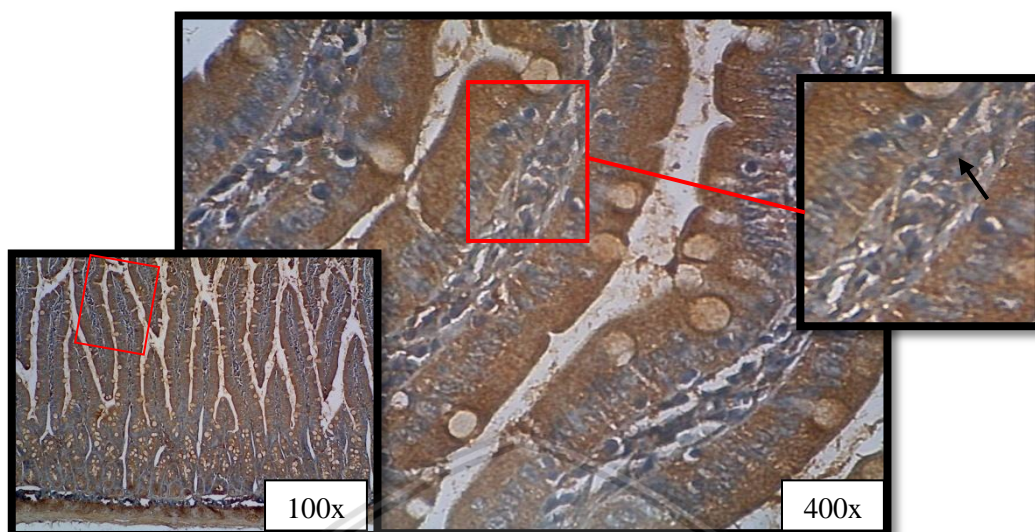
Salah satu parameter yang dapat digunakan untuk mengetahui adanya reaksi antiinflamasi adalah dengan mengamati ekspresi dari *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β) yang diamati secara langsung dari gambaran histopatologi organ jejunum yang telah dilakukan pewarnaan dengan metode immunohistokimia. Pada preparat immunohistokimia ekspresi TGF- β ditunjukkan dengan adanya warna coklat pada bagian sitoplasma dan makrofag. Warna coklat terbentuk karena adanya reaksi antara antigen TGF- β dalam jaringan dengan antibodi primer (*anti-rat* TGF- β) yang selanjutnya direaksikan lagi dengan antibodi sekunder. Munculnya warna coklat diakibatkan karena kompleks antigen antibodi dikenali oleh SAHRP, dan hasilnya ditambah dengan substrat kromagen DAB yang menghasilkan warna kecoklatan pada jaringan. Ekspresi TGF- β organ jejunum tikus pada tiap kelompok perlakuan dapat dilihat pada gambar bawah ini.



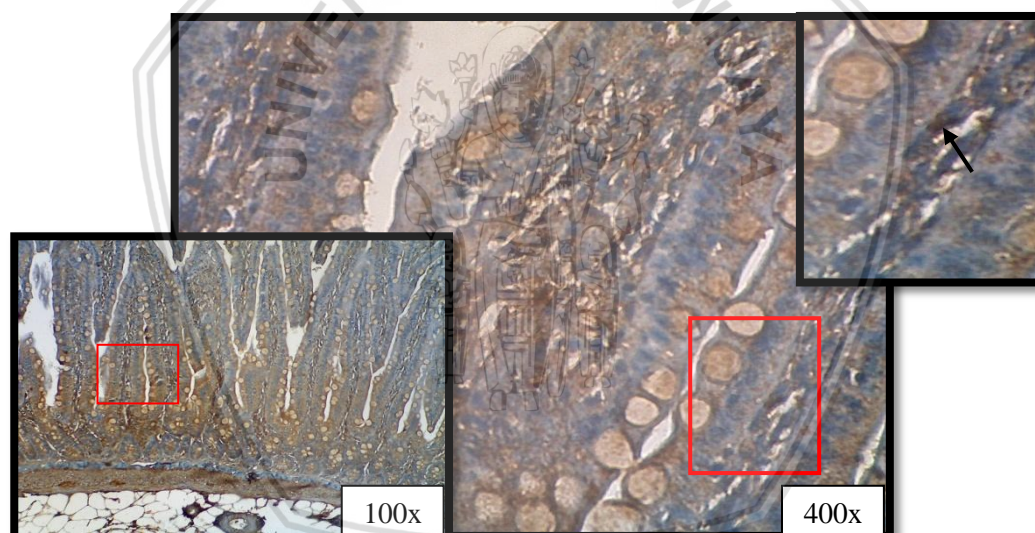
Gambar 5.2 Gambaran imunohistokimia ekspresi TGF- β pada jejunum tikus putih kelompok kontrol negatif. Keterangan (→): ekspresi TGF- β



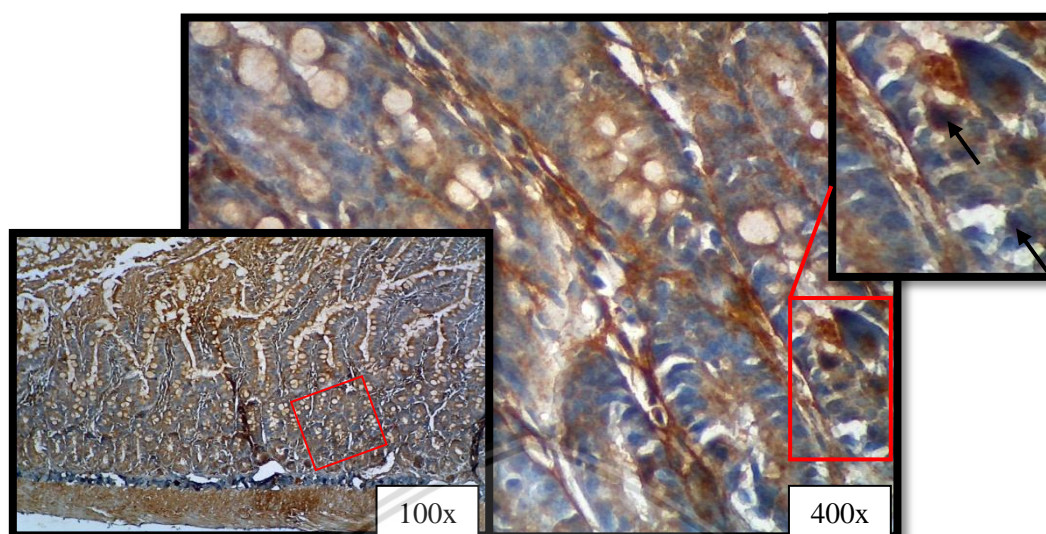
Gambar 5.3 Gambaran imunohistokimia ekspresi TGF- β pada jejunum tikus putih kelompok kontrol positif. Keterangan(→): ekspresi TGF- β



Gambar 5.4 Gambaran imunohistokimia ekspresi TGF- β pada jejunum tikus putih kelompok P1 dosis 500 mg/kgBB. Keterangan(\rightarrow): ekspresi TGF- β

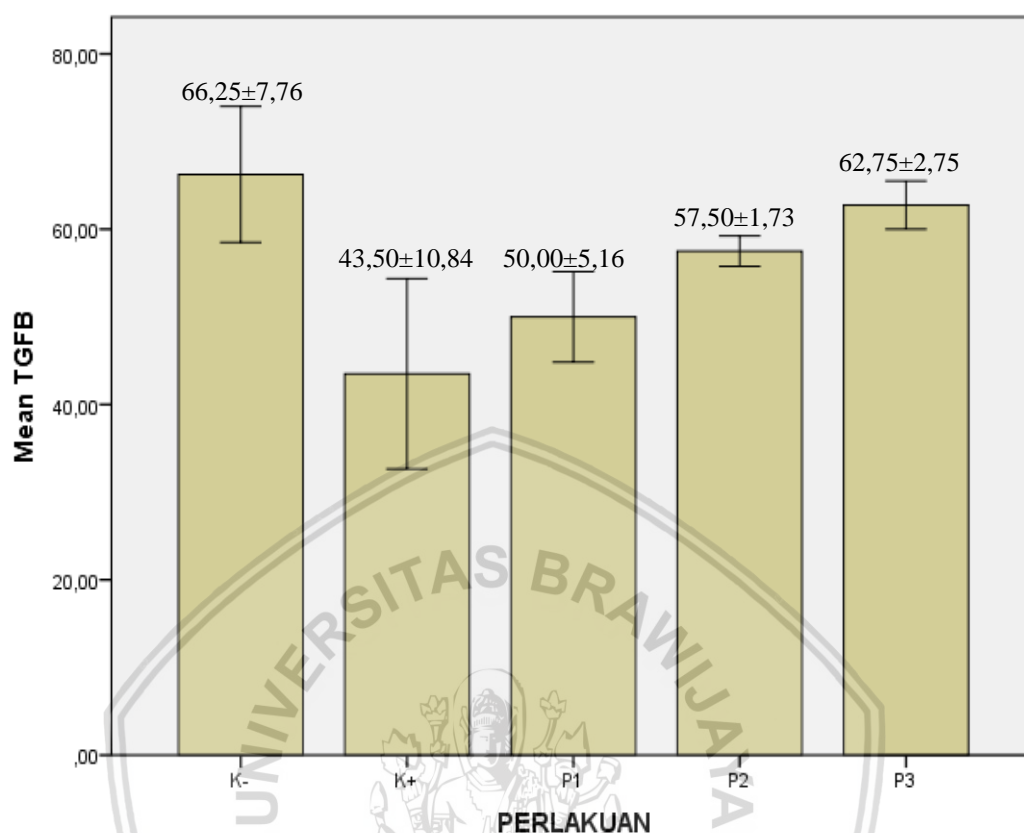


Gambar 5.5 Gambaran imunohistokimia ekspresi TGF- β pada jejunum tikus putih kelompok P2 dosis 1000 mg/kgBB. Keterangan(\rightarrow): ekspresi TGF- β



Gambar 5.6 Gambaran imunohistokimia ekspresi TGF- β pada jejunum tikus putih kelompok P3 dosis 1500 mg/kgBB. Keterangan(—→): ekspresi TGF- β

Data rata-rata ekspresi TGF- β yang diperoleh kemudian dianalisis secara statistika sehingga diperoleh hasil bahwa rata-rata ekspresi TGF- β tertinggi terdapat pada kelompok kontrol negatif (K-), terendah terdapat pada kelompok kontrol positif (K+) dan standar deviasi yang diperoleh pada masing-masing kelompok pada rentang 1,73-10,84. Standar deviasi menunjukkan sebaran data dalam sampel. Histogram hasil perhitungan ekspresi TGF- β ditunjukkan pada **Gambar 5.7**.



Gambar 5.7 Histogram nilai *mean* dan standar deviasi ekspresi TGF- β .

Keterangan: K(-)= kontrol negatif, K(+)= kontrol positif, P1= Preventif I (dosis 500 mg/kgBB), P2= (dosis 1000 mg/kgBB), dan P3= (dosis 1500 mg/kgBB).

Hasil yaitu berupa data kuantitatif yang didapatkan dari rata-rata perhitungan presentase dari area 5 bidang sudut pandang yang diamati dari mikroskop perbesaran 400x dan selanjutnya dianalisa dengan menggunakan program *immunoratio software*. Hasil data angka tersebut diolah dengan menggunakan SPSS berdasarkan statistika dilakukan uji normalitas dan homogenitas (**Lampiran 5**). Selanjutnya dilakukan uji statistik *One Way ANOVA* (**Lampiran 5**) yang diperoleh hasil nilai $\text{Sig.} < 0,05$. Hasil data tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *green coffee* robusta memiliki pengaruh terhadap ekspresi TGF- β pada organ jejunum tikus putih model gastroenteritis. Uji lanjutan yang dilakukan adalah dengan uji BNJ atau *tukey* (**Lampiran 5**) pada

tingkat nilai signifikansi ($p < 0,05$) yang diperoleh hasil data seperti pada **Tabel 5.1** di bawah ini.

Tabel 5.1 Hasil Uji BNJ Ekspresi TGF- β

Perlakuan	Rata-rata ekspresi TGF- β \pm SD	Ekspresi TGF- β (%)	
		Peningkatan terhadap kontrol positif	Penurunan terhadap kontrol negatif
Kontrol negatif (normal)	66,25 \pm 7,76 ^c	-	-
Kontrol positif (gastroenteritis)	43,50 \pm 10,84 ^a	-	34,34 %
Perlakuan 1 (preventif dosis 500 mg/kgBB)	50,00 \pm 5,16 ^{ab}	14,94 %	-
Perlakuan 2 (preventif dosis 1000 mg/kgBB)	57,50 \pm 1,73 ^{abc}	32,18 %	-
Perlakuan 3 (preventif dosis 1500 mg/kgBB)	62,75 \pm 2,75 ^{bc}	44,25 %	-

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan ($p < 0,05$)

Berdasarkan pada hasil tabel di atas menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif memiliki rata-rata ekspresi TGF- β yang berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan 1, tetapi tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) dengan kelompok perlakuan 2 dan perlakuan 3 (**Lampiran 5**). Pada kelompok kontrol negatif merupakan kelompok yang tanpa adanya perlakuan injeksi deksametason, infeksi *E. coli* dan terapi ekstrak *green coffee* robusta. Kelompok kontrol negatif ini digunakan sebagai kelompok acuan dalam menentukan adanya peningkatan atau penurunan yang terjadi karena pengaruh kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan (P1, P2, P3).

Ekspresi TGF- β pada kelompok kontrol negatif dapat ditunjukkan (**Tabel 5.1**) memiliki rata-rata tertinggi dibandingkan kelompok lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa TGF- β selalu ada berada di dalam tubuh meskipun saat

kondisi tubuh dalam keadaan sehat atau normal dengan nilai yang relatif stabil. TGF- β adalah sitokin regulator yang berperan sebagai antiinflamasi, yang berfungsi untuk sitokin pengatur homeostasis pada tubuh (Linda and Feagins 2010).

Pada kelompok kontrol positif menunjukkan nilai rata-rata ekspresi TGF- β yang berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif dan kelompok P3, tetapi tidak berbeda nyata dengan kelompok P1 dan P2. Ekspresi TGF- β pada kelompok kontrol positif (**Tabel 5.1**) mengalami penurunan terhadap kelompok kontrol negatif, yaitu sebesar 34,34 %. Penurunan tersebut dapat terjadi karena adanya paparan *E. coli* patogen yang memicu timbulnya inflamasi. Bakteri *E. coli* melakukan perlekatan dengan sel epitel jejunum yang diperantarai oleh *adhesin intimin* pada fimbriae yang sangat kuat hingga mikrovili seperti terkelupas dan sel goblet terlepas bersama sel epitel permukaan jejunum yang mengalami erosi, sehingga tidak ada *barrier protector* pada mukosa jejunum. Selain itu *E. coli* juga mengeluarkan endotoksin berupa lipopolisakarida (LPS) yang dilepaskan saat bakteri mengalami lisis atau pecahnya sel. Endotoksin ini menyebabkan ketidakseimbangan ROS dan antioksidan dalam tubuh dan menyebabkan terjadinya kondisi stres oksidatif (Supar, 2001). Keadaan stres oksidatif ini akan memicu aktivasi NF- κ B dan fosforilasi inhibitor NF- κ B. Adanya NF- κ B menyebabkan terjadinya infiltrasi sel makrofag pada lokasi inflamasi untuk memfagositosis bakteri, sehingga produksi sitokin proinflamasi (TNF- α) yang berlebih (Bueno and Anna, 2013). Produksi TNF- α yang meningkat dapat mengaktivasi limfosit T.

Limfosit terbagi menjadi atas sel Th1 dan Th2. Sel Th1 memproduksi sitokin proinflamasi seperti $\text{TNF-}\alpha$, IL-1, IL-12, $\text{IFN-}\gamma$ yang membantu dalam meningkatkan respon inflamasi. Sel Th2 mensekresikan sitokin antiinflamasi yaitu $\text{TGF-}\beta$ yang mempunyai efek supresi sel-sel imun mencakup deaktivasi dalam produksi makrofag dan menghambat proliferasi Th1. Sehingga secara tidak langsung jika terdapat adanya peningkatan atau meningginya nilai produksi sitokin proinflamasi akan berhubungan dengan menurunnya sitokin regulator yaitu $\text{TGF-}\beta$. Dalam saluran pencernaan salah satunya adalah organ jejunum, $\text{TGF-}\beta$ berperan untuk menjaga toleransi usus, mempertahankan dan memperbaiki jaringan yang dengan cara akumulasi matriks ekstraseluler, proliferasi dan migrasi fibroblas pada usus. Apabila ekspresi $\text{TGF-}\beta$ turun mengakibatkan terjadinya inflamasi, sehingga akan meningkatkan aktivasi neutrofil serta pelepasan enzim protease yang dapat menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan.

Pada kelompok perlakuan 1 (dosis 500 mg/kgBB) dan perlakuan 2 (dosis 1000 mg/kgBB) menunjukkan rata-rata ekspresi $\text{TGF-}\beta$ yang berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok kontrol negatif dan tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) dengan kelompok kontrol positif. Pada kedua kelompok perlakuan (dosis 500 mg/kgBB dan 1000 mg/kgBB) sudah dapat meningkatkan ekspresi $\text{TGF-}\beta$ pada tikus model gastroenteritis tetapi masih belum maksimal. Sedangkan kelompok perlakuan 3 (dosis 1500 mg/kgBB) menunjukkan rata-rata kadar ekspresi $\text{TGF-}\beta$ yang berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok kontrol positif dan tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) dengan kelompok kontrol negatif (**Lampiran 5**), sehingga dapat dikatakan bahwa preventif dengan dosis 1500 mg/kgBB sudah optimal meskipun

belum termasuk dosis yang tepat dalam mampu meningkatkan ekspresi TGF- β , dikarenakan nilai rata-rata yang hampir mendekati seperti dengan kontrol negatif dibandingkan kelompok perlakuan lainnya,

Pemberian preventif ekstrak *green coffee* robusta yang dapat meningkatkan ekspresi TGF- β dikarenakan biji kopi terdapat kandungan asam klorogenat yang tinggi. Senyawa asam klorogenat memiliki efek antioksidan yang tinggi dan antiinflamasi (Liang *and* Kitts, 2015), serta sebagai antibakteri (Farah *et al.*, 2008).

Menurut Liang *and* Kitts (2015), asam klorogenat berperan sebagai antioksidan dengan menyumbangkan atom hidrogen untuk mengurangi radikal bebas dan menghambat reaksi oksidasi, sehingga radikal bebas tidak membutuhkan elektron dari membran sel yang dapat menyebabkan kerusakan sel. Berkurangnya radikal bebas akan menekan pembentukan NF- κ B yang memicu produksi sitokin, sehingga aktivasi sel radang berkurang (Janeway *et al.*, 2001).

Efek asam klorogenat sebagai antiinflamasi yaitu dengan menghambat produksi sitokin proinflamasi yang dirangsang oleh LPS pada sel melalui jalur signal NF- κ B (Hwang *et al.*, 2013). Hal ini didukung dengan pendapat Shan *et al.*, (2009) dikonfirmasi bahwa senyawa asam klorogenat menunjukkan aktivitas antiinflamasi dengan menekan rangsangan LPS dan menghambat aktivitas enzim siklooksigenase-2 (COX-2) melalui penurunan aktivitas dari NF- κ B. Dimana COX-2 berperan dalam mediator inflamasi dengan ikut terlibat dalam pelepasan asam arakidonat yang berguna dalam tahap awal dari respon adanya inflamasi. Penurunan aktivitas NF- κ B dan fosforilasi inhibitor NF- κ B akan mengalami

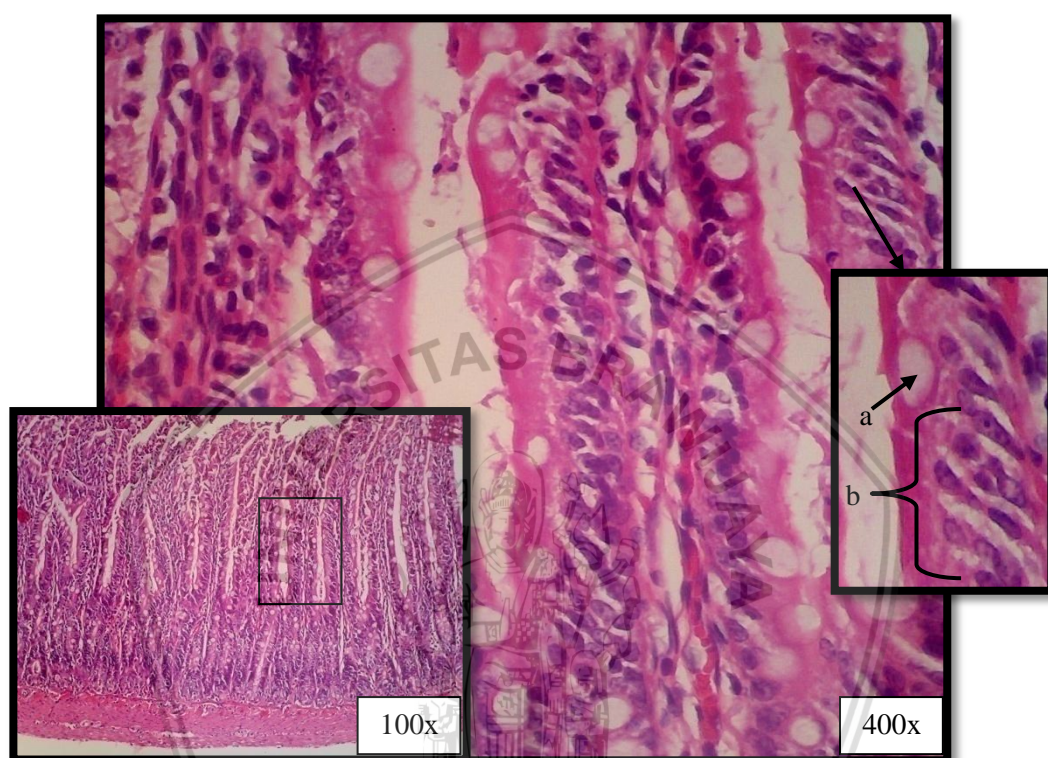
deaktivasi, sehingga terjadi penurunan ekspresi sitokin TNF- α yang diimbangi dengan peningkatan TGF- β sebagai faktor keseimbangan toleransi mukosa, perbaikan integritas jaringan dan menurunkan aktivitas neutrofil mengakibatkan kerusakan jaringan dapat dihambat. Selain itu, TGF- β yang meningkat memicu integrin dalam mengontrol reaksi perbaikan jaringan melalui produksi kolagen, matriks ekstraseluler dan fibroblas sehingga mengurangi inflamasi pada organ jejunum.

Menurut Lou *et al.*, (2011) mengatakan bahwa mekanisme antibakteri asam klorogenat dengan merangsang perubahan permeabilitas membran sel menjadi ireversibel sehingga menyebabkan gangguan potensial membran sel bakteri, dan keluarnya makromolekul sitoplasma seperti nukleotida. Hal ini didukung dengan pendapat dari Galves *et al.*, (2017) menyatakan bahwa asam klorogenat memiliki fungsi sebagai antimikroba terhadap berbagai spesies bakteri dengan mengganggu permeabilitas dinding sel bakteri.

5.3 Pengaruh Preventif Ekstrak *Green Coffee (Coffea canephora)* terhadap Histopatologi Jejunum

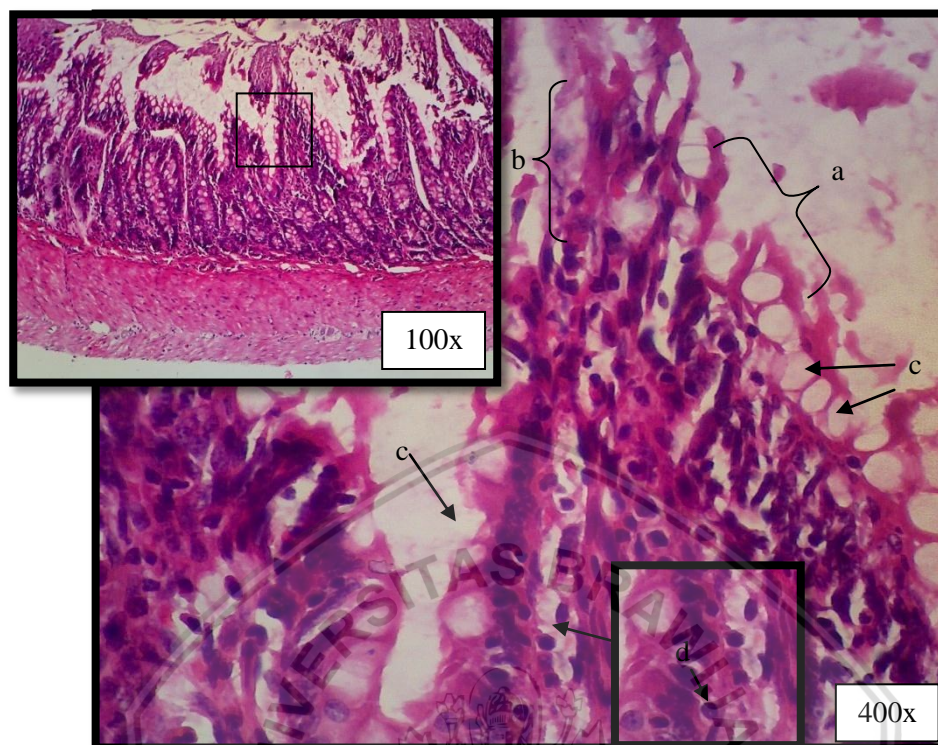
Selain mengukur ekspresi TGF- β , parameter lainnya yang digunakan dalam penelitian hewan coba model gastroenteritis adalah pengamatan histopatologi organ jejunum pada tikus yang dilakukan pewarnaan *Hematoxyline Eosine*. Pada penelitian dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (tikus sehat), kontrol positif (tikus sakit) dan 3 kelompok perlakuan yang diberi preventif ekstrak *green coffee* robusta dengan dosis pemberian 500 mg/kgBB, 1000 mg/kgBB, 1500 mg/kgBB. Gambaran histologi organ jejunum

normal dapat terlihat dari tunika mukosa dengan vili yang berbentuk panjang dan tipis. Jejunum memiliki 4 lapisan, yaitu tunika mukosa, tunika submukosa, tunika muskularis, dan tunika serosa (Peckham, 2014).



Gambar 5.8 Histologi jejunum kelompok kontrol negatif dengan pewarnaan HE. a) Sel goblet tampak normal; b) Sel epitel normal

Hasil gambaran histologi pada kelompok kontrol negatif (**Gambar 5.8**) terlihat gambaran jejunum tidak ditemukan adanya kerusakan yang dalam keadaan normal meliputi keadaan epitel permukaan berbentuk silindris selapis yang rapi dan utuh, sel goblet yang tampak baik, vili memanjang dan utuh. Gambaran histologi dari kelompok kontrol negatif ini dijadikan sebagai acuan keadaan normal pada kelompok lainnya. Hasil penelitian Towoliu dkk (2013) menyatakan bahwa gambaran mukosa usus halus normal ditunjukkan dengan permukaan epitel yang utuh, jumlah limfosit sedikit dan tidak ada pelebaran pembuluh darah.



Gambar 5.9 Histopatologi jejunum kelompok kontrol positif dengan pewarnaan HE.

a) Kerusakan permukaan vili; b) Sel epitel erosi; c) Hiperplasia, hipertropi dan loss dari sel goblet; d) Sel radang limfosit

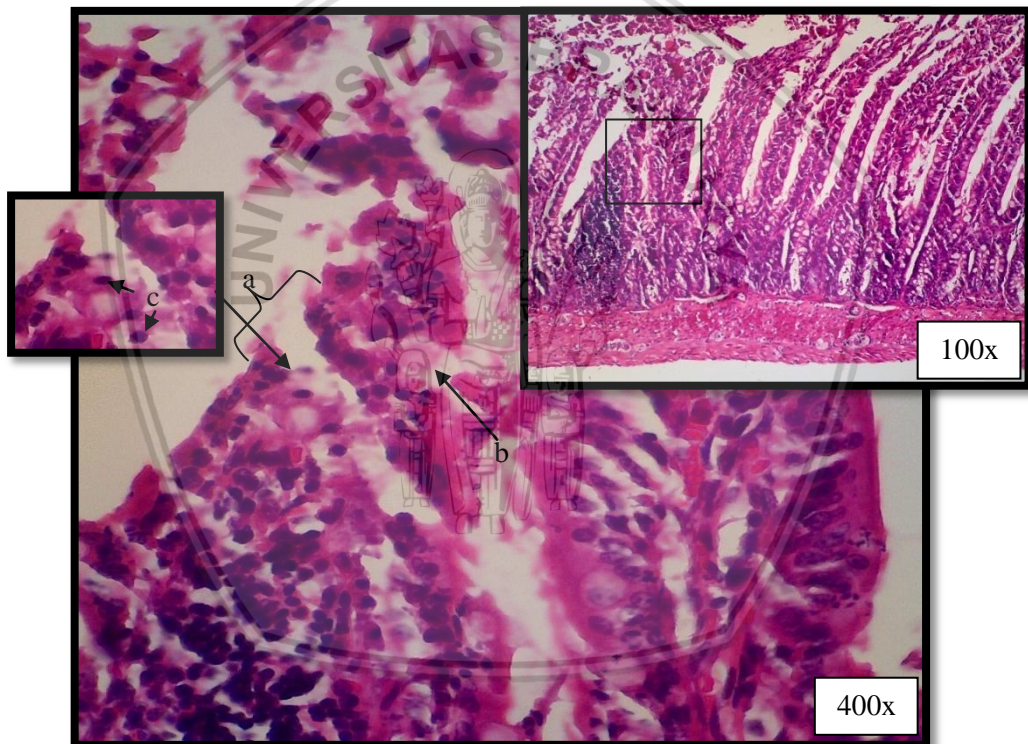
Hasil histopatologi pada kelompok kontrol positif (**Gambar 5.9**) menunjukkan terdapatnya kerusakan usus yang berupa adanya kerusakan permukaan vili, infiltrasi sel radang, hiperplasia dan hipertropi sel goblet, beberapa sel goblet hilang atau pecah dan erosi sel epitel permukaan. Gambaran histopatologi pada kelompok kontrol positif ini dijadikan sebagai acuan kerusakan jaringan jejunum pada tikus putih. Kerusakan organ jejunum diakibatkan adanya infeksi bakteri *E. coli* yang berkembang di dalam usus yang sebelumnya dilakukan injeksi deksametason. Deksametason dapat mendepresi sistem imun (*immunosupressan*) yaitu menghambat proliferasi dari sel leukosit terutama limfosit sehingga antibodi (immunoglobulin) tidak diproduksi (Murphy *et al.*, 2011). Dengan keadaan tersebut menyebabkan bakteri *E. coli* dengan mudah

untuk menginfeksi usus. *E. coli* akan berikatan dengan sel hospes dan membentuk koloni kemudian akan mentraslokasikan protein virulen dan LPS yang menyebabkan terjadinya lesi A/E. Bakteri *E. coli* melekat dan berkoloni hingga invasi ke sel hospes yang akan menyebabkan kerusakan mukosa usus seperti erosi epitel dan ruptur vili. Adanya infeksi dari *E. coli* menyebabkan terjadinya infiltrasi sel radang sebagai respon inflamasi (Lei *et al.*, 2015).

Bakteri *E. coli* terutama menyerang jejunum karena ukuran jejunum yang lebih panjang dibandingkan dengan duodenum dan ileum sehingga paparan *E. coli* cenderung lebih lama di jejunum. Selain itu, jejunum memiliki regenerasi sel epitel yang lebih lambat dibandingkan dengan duodenum dan ileum sehingga eliminasi *E. coli* yang menempel pada sel epitel vili juga menjadi lambat (Louaka *et al.*, 2009).

Sel goblet berperan dalam menghasilkan suatu lendir yaitu cairan mukus yang dilepaskan ke permukaan epitel. Mukus melindungi sel-sel epitel dari infeksi mikroorganisme dan partikel lain yang berbahaya. Bila terjadi infeksi, sel-sel goblet akan mengeluarkan lebih banyak mukus yang akan mempercepat pengeluaran mikroorganisme tersebut (Azrimaidaliza, 2007). Peningkatan jumlah dan ukuran sel goblet merupakan bentuk pertahanan tubuh terhadap invasi mikroorganisme dan produk toksin, hal ini menunjukkan aktivitas sel goblet dalam peningkatan produksi mukus. Peningkatan produksi mukus karena adanya inflamasi usus akibat dari adanya infeksi bakteri (Jeboori *and* Jasad, 2016; Frappier, 2006). Beberapa sel goblet hilang atau ikut terlepas akibat terjadinya erosi sel epitel pada permukaan vili.

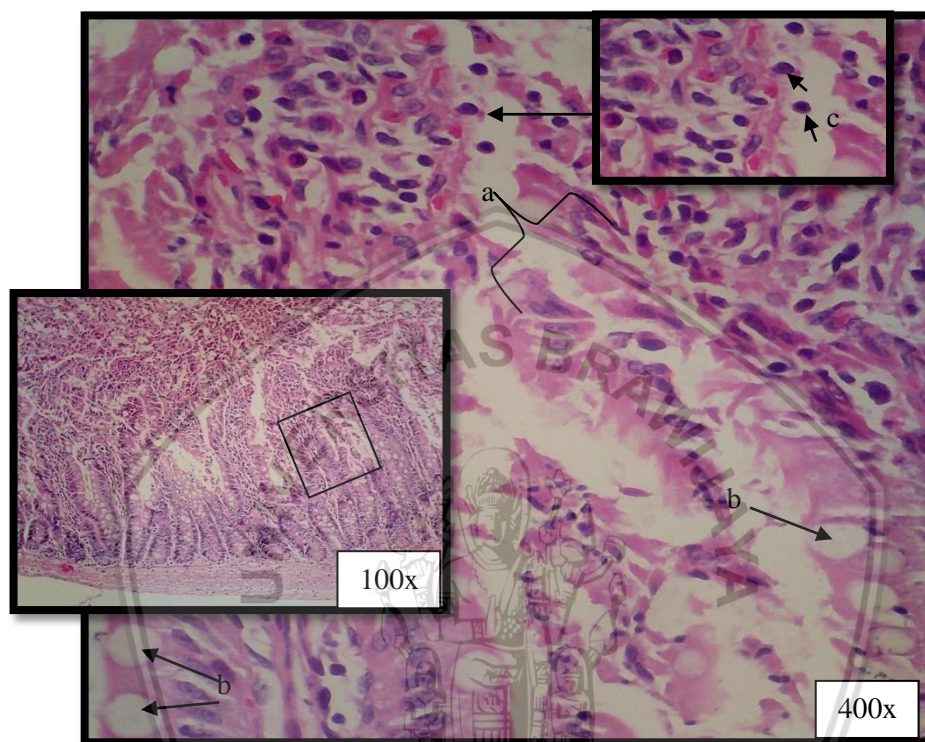
Erosi epitel permukaan terjadi karena strain *E. coli* yang bersifat patogen menempel secara kuat pada permukaan epitel vili dan merusak epitel permukaan usus. Ciri patogenitas dari penempelan ini terletak pada tumpuannya di permukaan sel inang dan menyebabkan kerusakan pada permukaan vili dan merusak epitel usus halus (Fitrial, 2009). Kerusakan vili mengakibatkan penyerapan nutrisi dan keseimbangan osmotik sel epitel usus terganggu sehingga menyebabkan diare (William *et al.*, 2013).



Gambar 5.10 Histopatologi jejunum kelompok kontrol preventif 1 (dosis 500 mg/kgBB) dengan pewarnaan HE. a) Erosi epitel; b) Sel goblet hilang; c) Sel radang limfosit

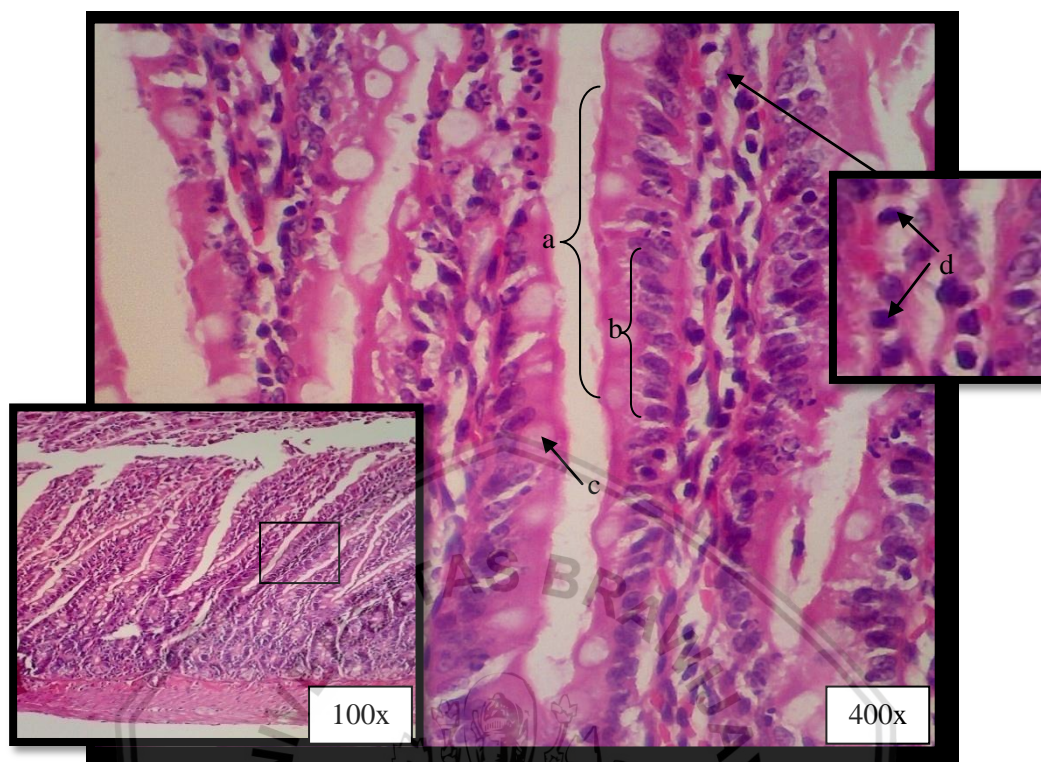
Hasil histopatologi kelompok preventif 1 (**Gambar 5.10**) ditemukan adanya kerusakan pada permukaan vili, infiltrasi sel radang, beberapa sel goblet hilang atau pecah dan erosi epitel. Kondisi ini lebih baik dibandingkan dengan kelompok kontrol positif yang tampak adanya hiperplasia, hipertropi dan

hilangnya sel goblet, peningkatan infiltrasi sel radang, erosi epitel yang luas. Pada keadaan ini ekstrak *green coffee* robusta dengan dosis 500 mg/kgBB belum mampu untuk menurunkan kerusakan jaringan jejunum.



Gambar 5.11 Histopatologi jejunum kelompok kontrol preventif 2 (dosis 1000 mg/kgBB) dengan pewarnaan HE. a) Erosi epitel; b) Hipertrofi sel goblet; c) Sel radang limfosit

Hasil histopatologi kelompok preventif 2 (**Gambar 5.11**) menunjukkan masih ditemukan adanya kerusakan permukaan vili, hipertofi sel goblet, sel radang, dan erosi epitel. Kondisi ini terlihat lebih baik dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dan kelompok preventif 1 meskipun masih terlihat adanya beberapa kerusakan di vili. Pada keadaan ini menunjukkan bahwa pemberian *green coffee* dengan dosis 1000 mg/kgBB sudah dapat menurunkan beberapa kerusakan di permukaan vili jaringan jejunum.



Gambar 5.12 Histopatologi jejunum kelompok kontrol preventif 3 (dosis 1500 mg/kgBB) dengan pewarnaan HE. a) Struktur vili tampak utuh; b) Sel epitel normal dan utuh; c) Sel goblet normal; d) Sel radang limfosit

Sedangkan hasil histopatologi kelompok preventif 3 (**Gambar 5.12**) sudah tampak mendekati seperti pada kelompok kontrol negatif dimana terlihat adanya tampak vili yang memanjang dan utuh, susunan sel epitel yang rapi, sel goblet yang mulai tampak normal dan berkurangnya sel radang. Sehingga hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *green coffe* robusta dengan dosis 1500 mg/kgBB mampu menurunkan kerusakan jaringan jejunum yang lebih baik dibandingkan dengan preventif 1 dan preventif 2.

Pemberian preventif ekstrak *green coffee* (*Coffea canephora*) dikarenakan terdapat adanya kandungan senyawa asam klorogonat yang memiliki peran sebagai antibakteri, antiinflamasi dan antioksidan. Menurut pendapat Lou *et al.*, (2011) bahwa kandungan asam klorogenat pada kopi dapat memberikan efek

antibakteri dengan cara merusak permeabilitas dari membran bakteri, sehingga bakteri kesulitan melakukan adhesi (menempel) dengan sel hospes. Menurut Liang *and* Kitts (2015) memaparkan asam klorogenat berperan sebagai antioksidan dengan menyumbangkan atom hidrogen untuk mengurangi radikal bebas dan menghambat reaksi oksidasi, sehingga radikal bebas tidak membutuhkan elektron dari membran sel yang dapat menyebabkan kerusakan sel. Efek asam klorogenat sebagai antiinflamasi yaitu dengan menghambat produksi sitokin proinflamasi yang dirangsang oleh LPS pada sel melalui jalur signal NF- κ B (Hwang *et al.*, 2013).

Asam klorogenat yang terdapat dalam kopi mampu meningkatkan proliferasi *mesenchymal stem cells* (MSCs) pada usus. Secara umum sel intestinal akan beregulasi dalam beberapa hari untuk berproliferasi dan deferensiasi. Sel-sel epitel mukosa usus halus termasuk dalam kategori sel labil yang merupakan sel yang akan terus bermitosis dan berproliferasi menggantikan sel yang rusak. Pergerakan *stem cell* menuju membutuhkan waktu 3-5 hari kemudian akan berdeferensiasi menjadi sel-sel mukosa. Secara normal sel epitel intestinal akan teregenerasi secara terus menerus setiap 2-3 hari (Okamoto, 2011).

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Dari yang telah dilakukan dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemberian ekstrak *green coffee* (*Coffea canephora*) dengan dosis 1500 mg/kgBB merupakan dosis yang lebih baik dibandingkan lainnya dalam meningkatkan ekspresi *Transforming Growth Factors Beta* (TGF- β) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model gastroenteritis yang diinfeksi oleh bakteri *E. coli*.
2. Pemberian ekstrak *green coffee* (*Coffea canephora*) dengan dosis 1500 mg/kgBB dapat mencegah kerusakan jaringan jejunum pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model gastroenteritis yang diinfeksi oleh bakteri *E. coli*.

6.2 Saran

Saran yang dapat diambil dari penelitian ini, yaitu:

1. Dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui dosis toksisitas pemberian ekstrak *green coffee* robusta (*Coffea canephora*).
2. Penggunaan ekstrak *green coffee* robusta (*Coffea canephora*) untuk diaplikasikan pada hewan lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Aklimawati, L dan Mawardi, S. 2014. Karakteristik Mutu dan Agribisnis Kopi Robusta Di Lereng Gunung Tambora, Sumbawa. 30(2):159–80.
- Amin, L. Z. 2015. Tatalaksana Diare Akut. *CDK-230*, 24(7): 504-509.
- Astawan, M., T. Wresdiyati, I. I. Arief, dan E. Suhesti. 2011. Gambaran Hematologi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Disinfeksi *Escherichia coli* Enteropatojenik dan Diberikan Probiotik. *Media Peternakan*, 7-13.
- Ariesta, A. A. 2013. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Microwave Assisted Extracts from Coffee Ground Residue in Chiang Rai Province, Thailand. [Skripsi]. Bogor: Departement Food Science and Technology Faculty of Agriculture Technology Bogor Agriculture University.
- Azrimaidaliza. 2007. Vitamin A, Imunitas dan Kaitannya dengan Penyakit Infeksi. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*, 1(2): 90-96.
- Biswas., Guignot, J., and Servin A. L. 2006. *Escherichia coli* Strains Colonising The Gastrointestinal Tract Infection. *Gut*, 49(1): 47–55.
- Bueno, V and Anna, O. A. S. 2013. *Escherichia coli* Infection, Intimin and Toll-like Receptors. *Brazil SP*, 1627-1632.
- Caramori, G and A. Papi. 2004. Oxidants and Asthma. *Research Center on Asthma and COPD*. University of Ferrara. Italy. 59: 170-173.
- Carter, G. R and Wise, D. J. 2004. *Essential of Veterinary Bacteriology and Mycology 6th Ed*. Iowa: Blackwell Publishing.
- Chow, C. M., A. K. Leung and K. L. Hon. 2010. Acute Gastroenteritis: From Guidelines to Real Life. *Clinical and Experimental Gastroenterology 2010*, 3: 97-112.
- Croxen, M. A., and B. B. Finlay. 2010. Molecular Mechanism of *Escherichia coli* Pathogenecity. *Microbiology*, 26-37.
- Erben, U., C.Loddenkemper, K. Doerfel, S. Spieckermann, D. Haller, M. M. Heimesaat, M. Zeitz, B. Siegmund, and A. Kühl. 2014. A Guide to Histomorphological Evaluation of Intestinal Inflammation in Mouse Models. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 7(8): 4557-4576.
- Esfandiari, A., S. D. Widhyari, dan A. Hujarat. 2011. Diare Pada Sapi Neonatus Yang Ditantang *Escherichia coli* K-99. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 16(3): 191-197.
- Fadhilah, D. 2015. Ilmu Veteriner: Enteritis pada Hewan. <http://ilmu.veteriner.com/enteritis-pada-hewan/>. [7 November 2017]

- Faler, B. J., Macsata R. A., and Plummer D. 2006. Focus on basic science: Transforming growth factor- β and wound healing. Sage Publication. <http://pvs.sagepub.com/>. [29 November 2017]
- Farah, Adriana. 2012. *Coffee :Emerging Health Effects and Disease Prevention, First Edition*. John Wiley & Sons, Inc and Institute of Food Technologists (USA) : Wiley-Blackwell Publising Ltd; 2012.
- Farah, Adriana and Carmen M. D. 2006. Phenolic Coumpounds in Coffee. *Braz. J. Plant Physiol.* 2006, 18(1): 23-36.
- Farah A, Monteiro M, Donangelo C. M, and Lafay S. 2008. 5-O-Caffeoylquinic Acid (5- CQA) From Green Coffee Extract Are Highly Bioavailable In Humans. *Journal of Nutrition*, September: 2309–15.
- Fitrial, Y. 2009. Analisis Potensi Biji dan Umbi Teratai (*Nymphaea pubescens wild*) Untuk Pangan Fungsional Prebiotik dan Antibakteri *Escherichia coli Enteropatogenik* K.1.1 [Disertasi]. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Frappier, B. L. 2006. *Digestive System. Textbook of Veterinary Histology*. 6th Ed. Blackwell Publishing., Oxford.
- Galvez, J. S., L. Cisneros-Zevallos, and D. A. Jacobo-Velázquez. 2017. Chlorogenic Acid: Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome. *Molecules*, 22(358): 1-20.
- Goenawan. 2011. Komposisi Kopi. <http://goenawanb.com/agriculture/komposisi-kopi/>. [11 Januari 2018]
- Haque, M. R., S. H. Ansari, and A. Rashikh. 2013. Coffea Arabica Seed Extract Stimulate the Cellular Imune Function and Cyclophosphamide induced Imunosuppression in Mice. *Iran J. Pharm. Res.*, 12(1): 101-108.
- Hecimovic, I., Cvitanovic, A. B., Horzic, D., and Komes, D. 2011. Comparative Study of Polyphenols and Caffeine in Different Coffee Varieties Affected by The Degree of Roasting. *Food Chemistry*, 129(3) : 991-1000.
- Hendrayati, T. I. 2012. Perubahan Morfologi *Escherichia coli* Akibat Paparan Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cocoa*) Secara In Vitro [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Jember.
- Herman. 2003. *Membangkitkan Kembali Peran Komoditas Kopi Bagi Perekonomian Indonesia*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Hermendy, B. E., dan Pawarti, D. R. 2017. Peran *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β) Pada Rinitis Alergi. Dep/SMF Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok Bedah Kepala dan Leher Fakultas Kedokteran

Universitas Airlangga-RSUD Dr. Soetomo Surabaya. *Jurnal THT-KL*, Januari-April 2017, 10(1): 27-36.

Hwang, S. J., Kim, Y. W., Park, Y., Lee, H. J., and Kim, K. W. 2013. Anti-inflammatory Effects of Chlorogenic Acid in Lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 Cells. *Inflammation Research. Inflamm. Res.* (2014) 63: 81-90.

Inamoto T., M. Namba, W. M. Qi, K. Yamamoto, Y. Yokoo, H. Miyata, J. Kawano, T. Yokoyama, N. Hoshi, and H. Kitagawa. 2008. An Immunohistochemical Detection of Actin and Myosin in The Indigenous Bacteria-Adhering Sites of Microvillous Columnar Epithelial Cells in Peyer's patches and Intestinal Villi in The Rat Jejunum. *Journal Vet Med Sci, Vol. 70, No. 11*: 1153-1158.

Info Medion. 2011. Gangguan Pencernaan Akibat Infeksi Bakteri. <http://info.medion.co.id/index.php/artikel/broiler/penyakit/gangguan-pencernaan-akibat-infeksi-bakteri/>. [9 November 2017]

ITIS (*Integrated Taxonomic Information System*). 2011. *Coffea L.* http://itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=35189/. [11 Januari 2018]

Janeway, C. A., Paul, T., Mark, W., and Mark, J. S. 2001. *Immuno Biology 5th Edition*. Garland Publishing. New York.

Jeboori, KH. H. Al and Jasad, A. S. 2016. Pathological Study On Mice Intestine Experimentally Infected With Shiga Toxin Producing *E. coli* O26. *Al-Anbar J. Vet. Sci.*, Vol.9 No. (1), 2016.

Junqueira. 2010. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas 12th Edition*. McGraw-Hill Companies, Inc. USA.

Junqueira, LC. 2007. *Persiapan Jaringan untuk Pemeriksaan Mikroskopik*. Histology Dasar: Teks dan Atlas. Edisi 10. EGC. Jakarta: 3-5.

Jusuf, A. A. 2009. *Histoteknik Dasar*. Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.

Katzung, B. G., and A. J. Trevor. 2007. *Basic and Clinical Pharmacology 13th Edition*. Mc-Graw Hill. Boston.

Katzung, G. B., Masters, B. S., and Trevor J. A. 2013. *Farmakologi Dasar & Klinik*. Ed. 12 Vol. 2. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.

Kusuma, S. A. F. 2010. *Escherichia coli*. Makalah Farmasi. Universitas Padjajaran, Fakultas Farmasi.

- Lamanepa, M. E. L. 2005. Perbandingan Profil Lipid dan Perkembangan Lesi Aterosklerosis pada Tikus Wistar yang Diberi Diet Perasan Pare Dengan Diet Perasan Pare dan Statin. [Tesis]. Magister Ilmu Biomedik. Program Pascasarjana Universitas Diponegoro. Semarang.
- Lavoie, J. P. and W. Hinchcliff. 2008. *Blackwell's Five Minute Veterinary Consult Equine 2nd Ed.* Blackwell Publishing. USA.
- Lei F., Yuan G., Fen L., Rui H., Run-Lan C., and Yun Q. 2015. Shuang-Huang-Lian Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice Involving Anti-Inflammatory and Antioxidative Activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-9.
- Leonardis, D. A., Pizzella, L. and Macciola, V. 2008. Evaluation of Chlorogenic Acid and Its Metabolites as Potential Antioxidants for Fish Oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(10) : 941-948.
- Liang, N, and D. D, Kitts. 2015. Role of Chlorogenic Acids in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions. Departements of Food, Nutrition and Health the University of British Columbia. *Journal Nutrient*, 8(16): 103-390.
- Linda, A., and M. D. Feagins. 2010. Role of Transforming Growth Factor- β Inflammatory Bowel Disease and Colitis-associated Colon Cancer. *Inflamm Bowel Dis*. 2010, 16: 1963-1968.
- Louka, A. S., Jean, P. N., Claude, W., Eric, O., and Frederic T. 2009. The Enteropathogenic *E. coli* Effector Cif Induces Delayed Apoptosis In Epithelial Cells. *Infect imun* 77(12): 5471-5477.
- Lou, Z., Wang, H., Zhu, S., Ma, C., and Wang, Z. 2011. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Chlorogenic Acid. *J. Food Sci.* 76, M398–M403.
- Maksum, R. 2009. *Mikrobiologi*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 153-154.
- Marzuki, A. 2013. Studi Karakterisasi Bakteri *Eschericia coli* di Laboratorium Kesehatan Lumajang. <https://academia.edu/4139114/e.coli/> [2 Desember 2017]
- Mauviel, A. 2009. Transforming Growth Factor- β signaling in skin: Stromal to epithelial cross talk. *Journal of Investigative Dermatology*.
- Michael, Vogeser and Christoph Seger. A Decade of HPLC-MS/MS in the Routine Clinical Laboratory-Goals for Further Development. *Clinical Biochemistry Rev* 2008; 41; 649-662.

- Miller, S. D., J. C. Russel, H.E. MacInnes, J. Abdelkrim, and R.M. Fewster. 2010. Multiple Paternity in Wild Population of Invasive Rattus Species. *New Zealand Journal of Ecology*, 34(3):360-362
- Mitchell R. N. and R. S Cotran. 2003. *Acute and Chronic Inflammation: Robbins Basic Pathology 7th Ed.* Elsevier Saunders. Philadelphia: 33-59.
- Moon, Joon-Kwan., Hyui Sun Y., Takayuki S. Role of Roasting Condition in the Level of Chlorogenic Acid Content in Coffee Beans : Correlation with Coffee Acidity. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57(12):5365-5369
- Murphy, Glenn S., Szokol, Joseph W., Greenberg, Steven B., Avram, Michael J., Vender, Jeffery S., Nisman Margarita and Vaughn Jessica. 2011. Preoperative Dexamethasone Enhances Quality of Recovery After Laparoscopic Cholecystectomy. Effect on In-hospital and Postdischarge Recovery Outcomes. *Anesthesiology Perioperative Medicine*, 114(4): 882-890.
- Neilsen, F., Mikkelsen, B.B., Nielsen, J.B., Andersen, H.R., and Grandjean, P. 2005. Plasma Malondialdehyde as Biomarker for Oxidative Stress: Reference Interval and Effect of Life-style Factors. *Journal Clinical Chemistry*, 43(7): 1209-1214.
- Ngastiyah. 2005. *Perawatan Anak Sakit*. Edisi 2. Jakarta: EGC
- Nuria, M. C., E. P. Astuti, dan Sumantri. 2010. Antibacterial Activities of Ethyl Acetate Fraction of Methanol Extract from Sosor Bebek Leaves (*Kalanchoe pinnata pers*). *Mediagro*, 6(2): 51-61.
- Nurmasari, Mega. 2010. Pola Pemilihan Obat dan Outcome Terapi Gastroenteritis Akut (GEA) Pada Pasien Pediatri di Instalasi Rawat Inap Rumah Sakit PKU Muhammadiyah Surakarta Januari - Juni Tahun 2008 [Skripsi]. Jawa Tengah. Universitas Muhammadiyah.
- Okamoto, R. 2011. Epithelial Regeneration in Inflammatory Bowel Diseases. *Inflammation and Regeneration*, 31(3): 275-281.
- Panggabean, E. 2011. *Buku Pintar Kopi*. Jakarta: AgroMedia Pustaka.
- Pakyari, Mohammadreza, Ali Farrokhi, Mohsen Khosravi Maharlooeei, and Aziz Ghahary. 2013. *Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing*. Department of Surgery and Professional Fire Fighters' Burn & Wound Healing Research Laboratory, University of British Columbia. Canada
- Peckham, M. 2014. *At a Glance Histology*. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Poerwati, E. 2013. Determinan Lama Rawat Inap Pasien Balita dengan Diare. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 27(4): 241-244.

- Prihtiyantoro, W., Hartatik., Khusnan, M. Slipranata, dan F. Aziz. 2014. Karakterisasi Faktor Virulensi *Escherichia coli* Patogen Zoonotik (O157:H7) Isolat Asal Tinja Sapi Potong. *Agros*, 16(2) :401-411.
- Quinn, P. J., B. K. Markey, M. E. carter, W. J. Donnelly, and F. C. Leonard. 2002. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Wiley-Blackwell. USA.
- Rahardjo, P. 2012. *Kopi*. Penebar Swadaya. Jakarta. 7-38.
- Rahmawandani, F.I., I.M. Kardena dan I.K. Berata. 2014. Gambaran Patologi Kasus Kolibasilosis pada Babi. *Landrace. Indonesia Medicus Veterinus*, 3(4): 300-309.
- Saeed, A., H. Abd, and G. Sandstrom. 2015. Microbial Aetiology of Acute Diarrhoea in Children under Feve Years Age in Khartoum, Sudan. *Journal of Medical Microbiology*, 64(4): 432-437.
- Samuelson, D. A. 2007. *Textbook of Veterinary Histology*. Saunders Elsevier. China.
- Smoak, K.A. and Cidlowski, J.A. 2008. Glucocorticoid Signaling in Health and Disease. In Rey A.D., Chrousos G., Besedovsky H. *Neuroimmune Biology: The Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis*. Vol. 7: 33-53.
- Shan, J.; Fu, J.; Zhao, Z.; Kong, X.; Huang, H.; Luo, L.; Yin, Z. 2009. Chlorogenic Acid Inhibits Lipopolysaccharideinduced Cyclooxygenase-2 Expression In RAW264.7 Cells Through Suppressing NF- κ B and JNK/AP-1 Activation. *Int. Immunopharmacol*. 2009, 9, 1042–1048
- Sharp, P., dan Villano, J. 2013. *The Laboratory Rat Edisi 2*. CRC Press. California: 9-11.
- Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures*. Elsevier. United Stated of America.
- Suckow, M. A., S.H. Weisbroth and C.I., Franklin. 2006. *The Laboratory Rat*. Elsevier Academic Press. USA
- Sulaiman, S. M., G. Rajashekhar, P. J. Prakash, D.S Singh, and C. Saleem. 2010. Immunoprophylactic Activity of Immunol, a Polyherbal Formulation Againt Dexametason Induced Immunosuppression in Rat. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 1-3.
- Supar. 2001. Pemberdayaan Plasma Nutfah Mikroba Veteriner dalam Pengembangan Peternakan : Harapan Vaksin *E. coli* Enterotoksinogenik, Enteropatogenik, dan Verotoksigenik Isolat Lokal untuk Pengendalian Kolibasilosis Neonatal pada Anak Babi dan Sapi. Balai Penelitian Veteriner : Bogor.

- Suraatmaja. 2005. *Kapita Selekta Gastroenterologi Anak*. Denpasar: Sagung Seto.
- Susan, Hall., Ben D., Shailendra A., Andrew K., Devinder A., Catherine M. A Review of the Bioactivity of Coffee, Caffeine and Key Coffee Constituents on Inflammatory Responses Linked to Depression. *Food Research International*. 2015 ; 76 :626-636.
- Sutton, S. 2011. Determination of Inoculum for Microbiological Testing. *Microbiology Topics*, 15(3): 49-53.
- Suwarto & Octavianty, Y. 2010. *Budi Daya 12 Tanaman Perkebunan Unggulan*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Songer, J.G and Post, K.W. 2005. *Veterinary Microbiology. Bacterial and Fungal Agent of Animal Disease*. Elsevier Saunders. USA.
- Tarmudji. 2003. Kolibasilosis Pada Ayam: Etiologi, Patologi dan Pengendaliannya. *Wartazoa*, Vol. 13, No. 2: 65-73.
- Tuominen, V. J., S. Ruotoistenmaki, A. Viitanen, M. Jumppanen, and J. Isola. 2010. Immunoratio: A Publicly Available Web Application for Quantitative Image Analysis of Estrogen Receptor (ER), Progesterone Receptor (PR), and Ki-67. *Breast Cancer Research*. 12: 56.
- Towoliu, S., P. Lintong, dan C. Kairupan. 2013. Pengaruh Pemberian Lactobacillus terhadap Gambaran Mikroskopis Mukosa Usus Halus Tikus Putih Wistar (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi dengan *Escherichia coli*. Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi Manado. *Jurnal e-Biomedik (eBM)*, Vol 1, No 2: 930-934.
- Trihono, P. P. 2011. Peran Transforming Growth Factor Beta-1 pada Penyakit Ginjal. *Sari Pediatri*, 13(1) : 49-54.
- Try, Y.L. 2011. Hubungan Faktor Kesehatan Lingkungan Terhadap Angka Kejadian Diare Pada Anak Usia Balita di RW.04 Kelurahan Cilandak Barat, Kecamatan Cilandak, Jakarta Selatan Tahun 2011 [Skripsi]. Jakarta: Fakultas Kedokteran. Universitas Pembangunan Nasional Veteran.
- Ulung, G., dan Pusat Studi Biofarmaka LPPM IPB. 2014. *Sehat Alami dengan Herbal*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Utami, E. R. 2012. Antibiotik, resistensi, dan Rasionalitas Terapi. *Saintis*, 1(1): 124-138. s
- Waldron, N.H., Jones, C.A., Gan, T.J., Allen, T.K., Hab, A.S. 2012. Impact of Perioperative Dexamethasone on Postoperative Analgesia and Side-Effect: Systematic Review and Meta-Analysis. *British Journal of Anaesthesia*, 10.1093 Pp: 1-10

- Welch, R. A. 2006. The Genus *Escherichia*. *Prokaryotes*, 6: 60-71.
- Werdhasari, A. 2014. Peran Antioksidan Bagi Kesehatan. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*, 3(2): 59-68.
- Wibowo, M. H., dan A. E. T. Wahyuni. 2008. Studi Patogenesitas *Escherichia coli* Isolat Unggas pada Ayam Pedaging Umur 15 Hari. *Jurnal Veteriner*, 9(2): 87-93.
- Williams, J.M., Carrie, A.D., Alastair J. M. W., Mark R. F., Jennifer C. M., Michael D. B., Robert, S., Kevin, R. H., Lindsay J.H., Jorge H.C., Barry J.C., and Mark Prichard. 2013. A Mouse Model of Pathological Small Intestinal Epithelial Cell Apoptosis and Shedding Induced by Systemic Administration of Lipopolisaccharide. *Dis Model Mech* v.6(6); 2013 Nov. PMC3820262.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.
- Wresdiyati, T., Sri R.L., Yeni S., Irma I.A., dan Made A. 2013. Probiotik Indigenus Meningkatkan Profil Kesehatan Usus Halus Tikus yang Diinfeksi Enteropathogenic *Escherichia coli*. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. *MKB*, Vol. 45, No. 2, Juni 2013: 78-85.
- Yaqin, M.A., dan M. Nurmilawati. 2015. Pengaruh Ekstrak Kopi Robusta (*Coffea canephora*) sebagai Penghambat Pertumbuhan. Seminar Nasional XII Pendidikan Biologi FKIP UNS.
- Zein, U., Huda, Khalid S., dan Ginting J. 2004. Diare Akut Disebabkan Bakteri. Sumatera Utara: Fakultas Kedokteran, Universitas Sumatera Utara.
- Zhang, Xue-kang., Zhou, Xiao-ping., Zhang, Qin., Zhu, Feng. 2015. The Preventive Effect of Dexmedetomidine Against Intestinal Ischemia-reperfusion Injury in Wistar Rats. *Iran J Basic Med Sci*, Vol. 18, No. 6, Jun 2015.
- Zinnah, M.A., M.R. Bari., M.T. Islam and M.A. Islam. 2007. Characterization of *Escherichia coli* Isolated from Samples of Different Biological and Enviromental Sources. *Bang. J. Vet. Med* 5 (1 and 2) :25-32.